

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Anton Glasnović**

**Poremećaji izražaja  
osteoresorptivnoga citokina RANKL u  
bolesnika s multiplom sklerozom na  
kliničkom početku bolesti**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2015.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Anton Glasnović**

**Poremećaji izražaja  
osteoresorptivnoga citokina RANKL u  
bolesnika s multiplom sklerozom na  
kliničkom početku bolesti**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2015.**

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za molekularnu imunologiju na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga, Imunološkom laboratoriju Zavoda za fiziologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Zavodu za neurologiju, Kliničke bolnice “Dubrava” u Zagrebu.

Pokusi u sklopu ovog istraživanja omogućeni su sredstvima znanstvenoistraživačkog projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske 108-1080229-0142 (voditeljica prof.dr.sc. Danka Grčević).

Voditeljica rada: prof.dr.sc. Danka Grčević, dr. med.

*Prvenstveno zahvaljujem svojoj mentorici prof.dr.sc. Danki Grčević na uloženom vremenu, strpljenju, savjetima te ustrajnosti i svoj ostaloj pomoći jer bez nje ove disertacije nikako ne bi niti bilo.*

*Zahvaljujem se također i dr.sc. Hrvoju Cviji bez kojega se ne bi nikada dogodila suradnja između mene i moje mentorice. Uz to posebno bih istaknuo još i prof.dr.sc. Željka Romića, koji me zadužio svojom pomoći kada mi je bilo najpotrebnije.*

*Naravno, bez pomoći Sanje Ivčević, bacc. med. lab. dg. i Katerine Zrinski-Petrović, med. lab. teh. tehnički dio također ne bi bio zadovoljen pa se njima posebno zahvaljujem. Hvala i svim sestrama Zavoda za neurologiju i Zavoda za vaskularnu kirurgiju koje su bile tu svo vrijeme.*

*Zahvaljujem puno mojim roditeljima prvenstveno na emotivnoj, a onda i na financijskoj podršci tijekom čitavog školovanja jer da nije bilo njih niti ove disertacije ne bi.*

*I na kraju, posebno hvala Josipi što je uz mene.*

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Osobitosti multiple skleroze.....	1
1.1.1. Značaj imunološke reakcije.....	1
1.1.2. Pokusni model.....	2
1.1.3. Limfociti i citokini.....	3
1.1.3.1. Limfociti Th1.....	5
1.1.3.2. Limfociti Th2.....	5
1.1.3.3. Regulacijski limfociti T.....	6
1.1.3.4. Limfociti Th17.....	6
1.1.3.5. Značajke imunološkog odgovora limfocita Th u multiploj sklerozi.....	8
1.1.4. Etiologija i patogeneza multiple skleroze.....	11
1.1.4.1. Molekularna mimikrija u multiploj sklerozi.....	11
1.1.4.2. Propusnost krvno-moždane barijere u multiploj sklerozi.....	13
1.1.4.3. Imunološki odgovor u multiploj sklerozi.....	14
1.1.4.4. Infektivni čimbenici u patogenezi multiple skleroze.....	15
1.1.4.5. Okolišni čimbenici u patogenezi multiple skleroze.....	15
1.1.4.6. Genetski čimbenici u patogenezi multiple skleroze.....	16
1.1.5. Cerebrospinalni likvor u bolesnika koji boluju od multiple skleroze.....	17
1.1.5.1. Markeri upale u cerebrospinalnom likvoru bolesnika.....	17
1.1.5.2. Markeri demijelinizacije u cerebrospinalnom likvoru bolesnika.....	17
1.2. Kliničke značajke multiple skleroze.....	18

1.2.1. Simptomi i znakovi bolesti.....	18
1.2.1.1. Optički neuritis.....	19
1.2.1.2. Piramidni simptomi.....	19
1.2.1.3. Osjetni simptomi.....	20
1.2.1.4. Ostali simptomi.....	20
1.2.2. Klinički oblici multiple skleroze.....	21
1.2.3 Radiološke značajke multiple skleroze.....	23
1.2.4. Dijagnostički kriteriji za postavljanje dijagnoze multiple skleroze.....	25
1.2.5. Liječenje multiple skleroze.....	25
1.2.5.1. Liječenje relapsa.....	25
1.1.5.2. Bolest-modificirajuća terapija.....	27
1.3. Funkcionalna povezanost imunološkog i koštanog sustava – oste imunologija.....	28
1.3.1. Diferencijacija osteoklasta i koštani metabolizam.....	28
1.3.2. Osovina RANKL/RANK/OPG.....	29
1.3.2.1. RANKL.....	29
1.3.2.2. RANK.....	31
1.3.2.3. Osteoprotegerin.....	32
1.3.3. Regulacija stvaranja i aktivacije osteoklasta.....	32
1.3.3.1. Morfologija osteoklasta.....	33
1.3.3.2. Fiziologija osteoklasta.....	34
1.3.3.3. Djelovanje osteoklasta.....	34
1.3.4. Slijed diferencijacije osteoklasta.....	35
1.3.4.1. Signalni putevi receptora RANK.....	36
1.3.4.2. Uloga čimbenika NFATc1.....	39

1.3.4.3. Kostimulacijski signali za RANK.....	40
1.3.5. Osteoblastna regulacija osteoklastogeneze.....	41
1.3.6. Imunološka regulacija osteoklastogeneze.....	42
1.3.6.1. Uloga čimbenika RANKL u imunološkom sustavu.....	42
1.3.6.2. Regulacija osteoklastogeneze limfocitima T.....	43
1.4. Primarni poremećaj aktivnosti osteoklasta u multiploj sklerozi.....	45
1.4.1 Osteoporoza i multipla skleroza.....	46
1.4.2 Glukokortikoidi i osteoporoza.....	46
2. HIPOTEZA.....	48
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	48
4. MATERIJALI I METODE.....	49
4.1. Ispitanici.....	49
4.1.1. Bolesnici na kliničkom početku bolesti.....	51
4.1.2. Bolesnici s uznapredovalom bolešću.....	52
4.1.3. Kontrolni ispitanici.....	52
4.2. Metode.....	53
4.2.1. Uzimanje uzoraka.....	54
4.2.2. Izolacija RNA.....	54
4.2.3. Obrnuto prepisivanje i kvantitativne reakcija lančane polimeraze.....	55
4.2.4. Postupak ELISA.....	57
4.3. Statistička analiza.....	58
5. REZULTATI.....	59
5.1. Značajke bolesnika i kontrolnih ispitanika.....	59
5.2. Čimbenici osovine RANKL/RANK/OPG u krvi i cerebrospinalnom likvoru.....	62
5.3. Citokini i kemokini u krvi i cerebrospinalnom likvoru.....	71

5.4. Korelacije čimbenika osovine RANKL/RANK/OPG s izražajem proupalnih i imunosupresivnih medijatora.....	79
5.5. Korelacije čimbenika osovine RANKL/RANK/OPG s kliničkom procjenom aktivnosti bolesti i pokazateljima koštane pregradnje.....	84
6. RASPRAVA.....	91
6.1. Poremećaj funkcije imunološkog sustava koji uzrokuje razvoj multiple skleroze pridonosi poremećaju osovine RANKL/RANK/OPG.....	92
6.2. Profil čimbenika osovine RANKL/RANK/OPG promijenjen je u bolesnika koji boluju od multiple skleroze.....	94
6.3. Odnos proupalnih i imunosupresivnih citokina promijenjen je u bolesnika koji boluju od multiple skleroze.....	101
6.4. Aktivnost osovine RANKL/RANK/OPG povezana je s citokinskim/kemokinskim profilom i kliničkim parametrima bolesti.....	104
7. ZAKLJUČCI.....	106
8. SAŽETAK.....	108
9. SUMMARY.....	109
10. LITERATURA.....	110
11. ŽIVOTOPIS.....	131

## POPIS KRATICA

AIRE – autoimuni regulator (prema engl. *autoimmune regulator*)

ALCAM - adhezijske molekule aktiviranih leukocita (prema engl. *activated leukocyte adhesion molecules*)

AP - protein aktivator (prema engl. *activator protein*)

APC - stanice koje predaju antigen (prema engl. *antigen presenting cells*)

Atp6i - član vakuolarne protonske pumpe transporter  $H^+$  iona I (prema engl.  *$H^+$  transporting vacuolar proton pump member I*)

BMP - koštani morfogenetski protein (prema engl. *bone morphogenic protein*)

CAM - stanične adhezijske molekule (prema engl. *cell adhesion molecules*)

CCL - kemokin CC (prema engl. *C-C motif ligand*)

CCR - receptor za kemokin CC (prema engl. *C-C motif receptor*)

CD - limfocitni diferencijacijski antigen (prema engl. *cluster of differentiation*)

CIC - cirkulirajući imuni kompleksi (prema engl. *circulating immune complexes*)

CRP - C-reaktivni protein (prema engl. *C-reactive protein*)

CSL - cerebrospinalni likvor

c-Src - C-terminalna Src kinaza (prema engl. *C-terminal Src kinase*)

CXCL - kemokin CXC (prema engl. *C-X-C motif ligand*)

DAP - aktivacijski protein DNAX (prema engl. *DNAX activation protein*)

DC-STAMP - transmembranski protein specifičan za dendritične stanice (prema engl. *dendritic cell-specific transmembrane protein*)

EDSS - proširena ljestvica statusa invalidnosti (prema engl. *expanded disability status scale*)

EAE - eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis (prema engl. *experimental autoimmune encephalomyelitis*)



FcR $\gamma$  - receptor  $\gamma$  kristalizabilnog fragmenta (prema engl. *fragment, crystallisable, receptor  $\gamma$* )

Foxp3 - transkripcijski čimbenik Foxp3 (prema engl. *forkhead box P3*)

Gab - GRB2-pridružen vezujući protein (prema engl. *GRB2-associated-binding protein*)

HLA - ljudski leukocitni antigen (prema engl. *human leukocyte antigen*)

Gd - gadolinij (prema lat. *gadolinium*)

ICAM - međustanične adhezijske molekule (prema engl. *intercellular adhesion molecules*)

IGF – čimbenik rasta nalik inzulinu (prema engl. *insulin-like growth factor*)

IFN - interferon (prema engl. *interferon*)

IKK $\beta$  - podjedinica  $\beta$  inhibitora NF- $\kappa$ B kinaze (prema engl. *inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase subunit  $\beta$* )

IL - interleukin (prema engl. *interleukin*)

IRF – regulacijski čimbenik interferona (prema engl. *interferon regulatory factor*)

ITAM - imunoreceptorski aktivacijski motiv temeljen na tirozinu (prema engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*)

IU – međunarodne jedinice (prema engl. *international unit*)

JNK - c-Jun N-terminalna kinaza (prema engl. *c-Jun N-terminal kinase*)

LTBP3 - latentni za TGF- $\beta$  vezujući protein 3 (prema engl. *latent transforming growth factor  $\beta$  binding protein 3*)

MAPK - mitogenom aktivirana proteinska kinaza (prema engl. *mitogen activated protein kinase*)

MBP - mijelinski bazični protein (prema engl. *myelin basic protein*)

MBPL - materijal nalik na MBP (prema engl. *MBP-like material*)

M-CSF - čimbenik poticanja makrofagnih kolonija (prema engl. *macrophage colony-stimulating factor*)

MHC - glavni kompleks tkivne podudarnosti (prema engl. *major histocompatibility complex*)

MITF - transkripcijski čimbenik mikroftalmije (prema engl. *microphthalmia-associated transcription factor*)

MMP - matriksna metaloproteinaza (prema engl. *matrix metalloproteinase*)

MR - magnetska rezonanca (prema engl. *magnetic resonance*)

MS - multipla skleroza (prema engl. *multiple sclerosis*)

NFAT - nuklearni čimbenik aktiviranih stanica T, signalna molekula (prema engl. *nuclear factor of activated T-cells*)

NF-κB - nuklearni transkripcijski čimbenik κB (prema eng. *nuclear factor-κB*)

NK - prirodno ubilačke stanice (prema engl. *natural killer*)

NO - dušikov oksid (prema engl. *nitric oxid*)

OKV - oligoklonske vrpce

OPG - osteoprotegerin

OSCAR – osteoklastični receptor nalik imunoglobulinu (prema engl. *osteoclast-associated immunoglobulin-like receptor*)

PBMC – mononuklearne stanice periferne krvi (prema engl. *peripheral blood mononuclear cells*)

PD - membranski receptor za programiranu smrt (prema engl. *programmed cell death protein*)

PRR - receptor koji prepoznaje obrazac (prema engl. *pattern recognition receptor*)

PTH - paratireoidni hormon

qPCR – kvantitativna reakcija polimeraze u realnom vremenu (prema engl. *quantitative real-time polimerase chain reaction*)

RA - reumatoidni artritis (prema engl. *rheumatoid arthritis*)

RANK - receptor-aktivator nuklearnog čimbenika κB

RANKL - ligand za RANK receptor

ROR $\gamma$ t - transkripcijski čimbenik ROR $\gamma$ t (prema engl. *retinoic acid receptor-related orphan receptor  $\gamma$ t*)

RR - realpsno-remitirajući (prema engl. *relapse remitting*)

SP - sekundarno-progresivan (prema engl. *secondary progressive*)

STAT - signalna molekula STAT (prema engl. *signal transducer and activator of transcription*)

TAB2 - protein 2 koji se veže za TGF- $\beta$  aktiviranu proteinsku kinazu 1 (prema engl. *TGF- $\beta$  activated protein kinase 1-binding protein 2*)

Tbet - transkripcijski čimbenik Tbet (prema engl. *T-box expressed in T cells*)

TCR - T-stanični receptor (prema engl. *T cell receptor*)

TGF – transformirajući čimbenik rasta (prema engl. *transforming growth factor*)

Th - pomagački limfociti T (prema engl. *T helper*)

TNF - čimbenik tumorske nekroze (prema engl. *tumor necrosis factor*)

Tr1 - inducirane regulatorne stanice T (iTregs)

TRAF - adaptorski protein RANK receptora (prema engl. *tumour necrosis factor receptor-associated factor*)

TRAP - kisela fosfataza otporna na tartarat (prema engl. *tartrate-resistant acid phosphatase*)

Tregs - regulatorne stanice T (prema engl. *T regulatory cells*)

TREM - potičući receptor izražen na mijeloidnim stanicama (prema engl. *triggering receptor expressed by myeloid cells*)

VCAM - vaskularne adhezijske molekule (prema engl. *vascular adhesion molecules*)

VEGF - vaskularni endotelni čimbenik rasta (prema engl. *vascular endothelial growth factor*)

VLA - integrin VLA (prema engl. *very late antigen*)

# 1. UVOD

Multipla skleroza (MS, prema engl. *multiple sclerosis*) je kronična bolest središnjeg živčanog sustava složene etiopatogeneze. Predstavlja veliki javnozdravstveni problem, posebice stoga jer zahvaća mlađe dobne skupine i vodi trajnom invaliditetu zbog, još uvijek, nedovoljno učinkovitog liječenja.

## 1.1. Osobitosti multiple skleroze

MS je kronična autoimuna upalna bolest središnjeg živčanog sustava koja zahvaća mijelinizirane neurone središnjeg živčanog sustava te posljedično, u različitom opsegu, oštećuje njihov mijelin i aksone (1-3). Najčešći je uzrok netraumatskog invaliditeta povezanog s neurološkom bolešću u populaciji mlade i srednje dobi (4). Procjenjuje se da u svijetu ukupno od MS boluje oko dva milijuna ljudi, s prevalencijom od manje od 5/100.000 stanovnika u Središnjoj Africi do oko 30/100.000 stanovnika u Sjevernoj Europi i Sjevernoj Americi (3). Dva puta je češća u žena nego u muškaraca, a javlja se najčešće između 20. i 40. godine života. U pravilu, skloniji su joj ljudi bijele rase i to s rastućom prevalencijom i incidencijom u smjeru sjevernije od Ekvatora (5). Populacija koje se prije 15. godine života preseli s područja manje na područje veće incidencije, preuzima povećan rizik razvoja MS nove sredine (5,6).

### 1.1.1. Značaj imunološke reakcije

Imunološka reakcija, posebice djelovanje brojnih citokina, navodi se kao glavni mehanizam izazivanja demijelinizacijskog oštećenja u MS. Citokini dovode do privlačenja imunoloških stanica iz cirkulacije (ekstravazacije) i njihovog naseljavanja na mjestima budućeg demijelinizacijskog plaka. Osim toga, citokini sudjeluju i u oštećenju krvno-moždane barijere. Brojne druge molekule povezane s imunološkim odgovorom pomažu

ekstravazaciji imunoloških stanica i njihovom naseljavanju u bijeloj tvari središnjeg živčanog sustava, što posljedično oštećuje mijelinski omotač, a kasnije i aksone neurona.

### 1.1.2. Pokusni model

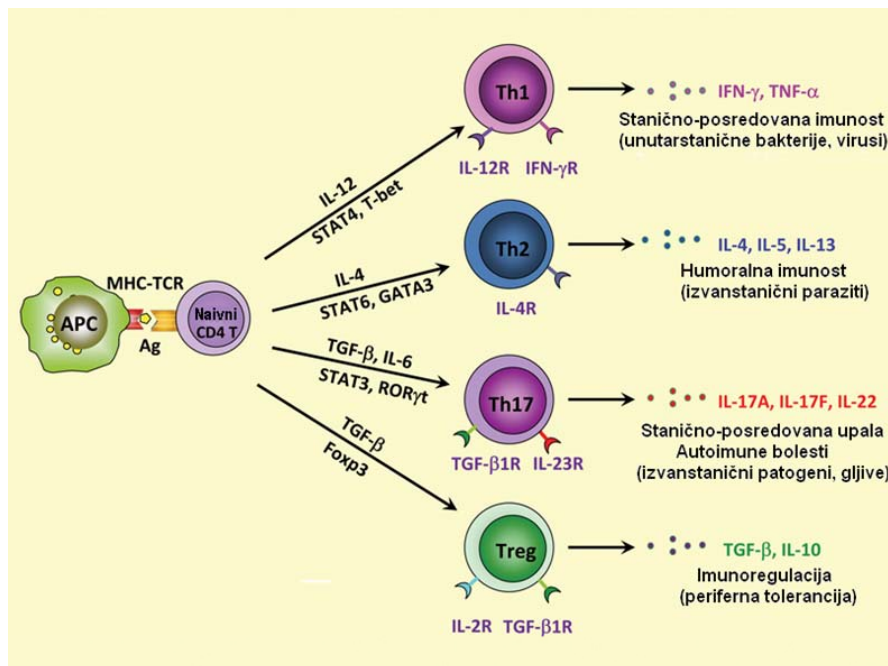
U životinja je moguće izazvati eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis (EAE, prema engl. *experimental autoimmune encephalomyelitis*), koji predstavlja pokusni model MS i ujedno podupire hipotezu o autoimunoj prirodi bolesti. U tom se modelu, u genetski prijemčljivu životinju, ubrizgava homogenat mijelinskih proteina (primjerice bazični mijelinski protein, proteolipidni protein i mijelinski oligodendrocitni protein). Na taj se način potiče diferencijacija specifičnih limfocita T, nazvanih encefalitogenim (7-10). Histološka analiza dokazuje da je upalni infiltrat sastavljen od limfocita T i B, makrofaga te aktivirane mikroglije (11). S obzirom da MS poglavito oštećuje bijelu tvar, u lezijama je znakovita primarna demijelinizacija s oštećenjem mijelinskog omotača oko očuvanih aksona, premda ponekad nalazimo i prekid aksona. Uz to, nasuprot opisanim lezijama znakovitim za relapsno-remitirajuću (RR, prema engl. *relapse remitting*) MS, u podmaklim stadijima bolesti i u sekundarno-progresivnoj (SP, prema engl. *secondary progressive*) MS, lezije se nalaze i u moždanoj kori, uz slabo aktivne lezije u bijeloj tvari (12).

U imunopatogenezi MS, prema spoznajama dobivenim u modelu EAE, ključna je uloga limfocita T. Oni se diferenciraju u podvrste pomagačkih limfocita Th (prema engl. *T helper*)  $CD4^{+}$  (prema engl. *cluster of differentiation*): Th1, Th2 i Th17. U klasičnoj teoriji imunopatogeneze MS osobito su važni pomagački limfociti Th1. Oni su povezani s relapsima bolesti, a glavni je dokaz ove tvrdnje da relapsima prethodi povećanje broja cirkulirajućih stanica koje luče interferon gama (IFN- $\gamma$ , prema engl. interferon  $\gamma$ ). Među stanicama periferne krvi koje luče IFN- $\gamma$ , najveći je udio limfocita Th1, koje ujedno imaju povećan kapacitet aktivacije makrofaga (13). Makrofazi pojačano izražavaju molekule glavnog kompleksa

tkivne podudarnosti (MHC, prema engl. *major histocompatibility complex*), te potiču prepoznavanje putem limfocita T i njihovu aktivaciju. Upravo se limfociti Th1 nakupljaju u moždanim lezijama miševa s izazvanim EAE i u bolesnika koji boluju od MS (14,15). Također, u bolesnika koji boluju od MS, davanjem IFN- $\gamma$  povećava se broj egzacerbacija (16). Međutim, postoje i studije koje naglašavaju da etiologija EAE nije podudarna etiologiji MS, pa je uloga limfocita Th1 u patogenezi MS i dalje predmet rasprava.

### **1.1.3. Limfociti i citokini**

Pomagački limfociti T CD4<sup>+</sup> izražavaju na svojoj membrani specifični receptor TCR (prema engl. *T cell receptor*), koji služi za specifično vezanje antigena, u slučaju MS većinom nekim od glikoproteina mijelinskog omotača neurona središnjeg živčanog sustava, pri čemu molekula CD4 služi kao koreceptor (17). Smatra se da su pojedini klonovi limfocita T potencijalno autoreaktivni, zbog određene specifičnosti receptora TCR, što predstavlja glavni okidač autoimune reakcije, uključujući i MS (18). Tako aktivirani pomagački limfociti T, specifični za mijelinske antigene, dalje se diferenciraju u podvrste Th1, Tregs (prema engl. *T regulatory cells*), Th2 i Th17 (Slika 1).



**Slika 1. Diferencijacija podvrsta limfocita Th.** Ovisno o citokinima koji djeluju na naivni limfocit T, diferencijacija se odvija u četiri smjera. U prisutnosti IL-12, diferencijacija u limfocite Th1 zahtjeva aktivaciju glavnog regulatornog transkripcijskog čimbenika T-bet preko STAT1 i STAT4. Limfociti Th1 proizvode IFN- $\gamma$  i uključene su u imunost posredovanu stanicama protiv unutarstaničnih bakterija i virusa. IL-4 potiče aktivaciju STAT6 i GATA3 koje su odgovorne za Th2 staničnu diferencijaciju. Limfociti Th2 su važni u humoralnoj imunosti usmjerenoj protiv parazita, akciju posredovanu njihovim stvaranjem IL-4, IL-5 i IL-13. Kombinacija TGF- $\beta$  i proupalnih citokina, kao što su IL-6 i IL-23, usmjerava diferencijaciju u limfocite Th koje proizvode IL-17 odnosno limfocite Th17 i to regulacijom STAT3 i ROR $\gamma$ t. Stanice Th17 igraju ključnu ulogu u zaštiti protiv izvanstaničnih patogena i u autoimunim upalnim bolestima. Dodatno, TGF- $\beta$  može potaći diferencijaciju u Foxp3<sup>+</sup> limfocite Treg, koje proizvode TGF- $\beta$  i IL-10 te djeluju kao modulatori imunološkog odgovora. APC, predložna stanica (prema engl. *antigen-presenting cell*); Foxp3<sup>+</sup>, prema engl. *forkhead box p3*<sup>+</sup>; IFN, interferon; MHC–TCR, prema engl. major histocompatibility complex–T-cell receptor; STAT, prijenosnik signala i aktivator transkripcije (prema engl. *signal transducer and activator of transcription*); ROR, prema engl. *retinoid-related orphan receptor*; TGF, transformirajući čimbenik rasta (prema engl. *transforming growth factor*); pomagački T (Th, prema engl. *T helper*); Treg, regulacijski T limfocit (prema engl. *regulatory T*). Modificirano prema: Leung S, Liu X, Fang L et al. The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. *Cell Mol Immunol*. 2010 May;7(3):182-9.

### 1.1.3.1. Limfociti Th1

Limfociti Th1 diferenciraju se tijekom primarne imunološke reakcije, aktivacijom naivnih limfocita T u mikrookolišu bogatom citokinom IL-12 (prema engl. *interleukin 12*), kojeg proizvode mijeloidne dendritične stanice te IFN- $\gamma$  kojeg proizvode plazmocitoide dendritičke stanice i stanice NK (prema engl. *natural killer*) (19). IL-12 je heterodimerne strukture, sastavljen od dvije podjedinice p35 i p40, te aktivira signalnu molekulu STAT4 (prema engl. *signal transducer and activator of transcription 4*). Interferoni prenose signal preko molekule STAT1. Signalni putevi posredovani molekulama STAT1 i STAT4 potiču transkripcijski čimbenik T-bet (prema engl. *T-box expressed in T cells*) koji je ključan za diferencijaciju naivnih limfocita T u podvrstu Th1 (20). Limfociti Th1 luče brojne citokine, od kojih ističemo IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  (prema engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ), IL-2 i IL-12. Fiziološki, ti citokini reguliraju stanični imunološki odgovor učinkovit protiv tumorskih stanica, virusa i bakterija i to aktivacijom makrofaga i citotoksičnih limfocita T. Uz to, limfociti Th1 posreduju neke tkivno-specifične autoimune bolesti, uključujući dijabetes ovisan o inzulinu, artritis, psorijazu i upalne intersticijske bolesti, u koje ubrajamo i MS (21).

### 1.1.3.2. Limfociti Th2

Podvrsta limfocita Th2 većinom djeluje protuupalno, lučeći citokine TGF- $\beta$  (prema engl. *transforming growth factor  $\beta$* ), IL-4, IL-5 i IL-13. Ta podvrsta limfocita potiče aktivaciju limfocita B, koji diferencijacijom u plazma-stanice i lučenjem imunoglobulina posreduju humoralnu imunost. Za njihovu diferencijaciju ključan je citokin IL-4, koji putem signalne molekule STAT6 susljedno aktivira transkripcijski čimbenik GATA-3. Sam GATA-3 potiče prepisivanje citokinskih gena ključnih za odgovor Th2 (21,22).



### 1.1.3.3. Regulacijski limfociti T

Podvrste regulacijskih limfocita T CD4<sup>+</sup> također imaju važnu ulogu u patogenezi MS. Ti limfociti izražavaju biljege CD4 i CD25, a uključuju nekoliko podvrsta, primjerice Tregs, Th3 i Tr1 (prema engl. *T regulatory cells 1*). Lučenjem citokina te podvrste reguliraju funkcije limfocita Th1 i Th2, održavajući tako homeostazu imunološkog sustava. Regulacijski limfociti T diferenciraju se u timusu iz naivnih limfocita T uz citokine IL-2 i TGF-β, čineći populaciju prirodnih Tregs. U perifernim limfnim organima naivni limfociti T mogu se uz citokin TGF-β, koji aktivira signalnu molekulu STAT5 i posljedično transkripcijski čimbenik Foxp3 (prema engl. *forkhead box P3*), diferencirati u inducibilne Tregs. Regulacijski limfociti T proizvode male količine IL-2 i IFN-γ te velike količine IL-10, IL-35 i TGF-β. Nužni su za održavanju periferne imunološke tolerancije jer nakon diferencijacije migriraju u periferne limfne odjeljke gdje suprimiraju aktivaciju i efektorske funkcije autoreaktivnih limfocita T. Uzimajući u obzir imunosupresivne funkcije i važnost u imunotoleranciji, regulacijski limfociti T predstavljaju važnu liniju obrane organizma od autoimunih bolesti (22, 23).

### 1.1.3.4. Limfociti Th17

Subpopulacija limfocita T CD4<sup>+</sup>, prvi puta izolirana u perifernoj krvi bolesnika koji boluju od Chronove bolesti, definirana je kao populacija koja luči velike količine citokina IL-17 i IL-23. Za diferencijaciju limfocita Th17 važan je IL-23, citokin heterodimerne strukture sastavljen od podjedinica p40 (koju dijeli s IL-12, važnim za diferencijaciju limfocita Th1) i p19 (jedinstvenu za IL-23). Miševi kojima nedostaje gen za podjedinicu p19 pokazuju normalan odgovor Th1 i potpuno odsutan odgovor Th17 (24). Na temelju te spoznaje i spoznaje da IL-12 i IL-23 koriste različite puteve signalne transdukcije, zaključeno je da se limfociti Th1 i Th17 mogu smatrati različitim funkcionalnim podvrstama limfocita T, naglašavajući važnost IL-23 u diferencijaciji limfocita Th17. Međutim, naivni limfociti T ne

izražavaju receptor za IL-23, nego je IL-23 nužan za preživljenje i funkciju limfocita Th17, posebice lučenje IL-17 znakovitoga za tu podvrstu. Ističe se da je za inicijalnu diferencijaciju mišjih limfocita Th17 potreban specifični citokinski mikrookoliš, posebice kombinacija citokina IL-6 i TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  i IL-6 djeluju preko signalnih molekula STAT3 i IRF4 (prema engl. *interferon regulatory factor 4*), koje reguliraju lučenje IL-23 i izražaj membranskog receptora za IL-23. Posljedično, autokrinom regulacijom, IL-23 potiče aktivaciju transkripcijskog čimbenika ROR $\gamma$ t (prema engl. *retinoic acid receptor-related orphan receptor  $\gamma$ t*) i lučenje IL-17 koji dovršava program diferencijacije i stvara stabilni fenotip limfocita Th17 (25). Također, IL-21, u suradnji s TGF- $\beta$ , potiče diferencijaciju limfocita Th17, aktivacijom transkripcijskog čimbenika ROR $\gamma$ t te pojačanjem izražaja receptora za IL-23 i IL-21 (24). Istraživanjima ljudskih limfocitnih populacija pokazuje se nešto drugačiji uzorak aktivacije. Ključni čimbenici diferencijacije limfocita Th17 su IL-1 $\beta$  i IL-23, dok TGF- $\beta$  nije nužan za taj proces, ali ga indirektno potiče, inhibicijom diferencijacije ostalih subpopulacija limfocita Th (25-29).

Sekrecijski profil limfocita Th17 je polimorfan. Glavni citokinski proizvod je IL-17 čiji specifični receptor je ubikvitarano izražen na različitim stanicama, primjerice fibroblastima, limfocitima T i B, različitim mononuklearnim stanicama koštane srži i endotelnim stanicama krvnih žila. Aktivacija receptora za IL-17 pokreće signalni put transkripcijskog čimbenika NF- $\kappa$ B (prema eng. *nuclear factor- $\kappa$ B*) i MAPK (prema engl. *mitogen activated protein kinase*), što susljedno potiče lučenje brojnih kemokina (CCL2, CCL7, CCL20 i CXCL1) i citokina (IL-6, IL-8, IL-21, IL-22, IL-26 i TNF- $\alpha$ ) te matriksne metaloproteinaza MMP-3 (prema engl. *matrix metalloproteinase*) i MMP-13 (10,30). Uz to, određene subpopulacije limfocita Th17 luče IFN- $\gamma$ .

Zaključno, aktivacija limfocita Th17 posreduje neutrofilnu infiltraciju i upalu, pa se stoga IL-17 smatra vrlo potentnim proupalnim citokinom. Također, limfociti Th17 potiču tkivno

razaranje tijekom upalnog procesa te podržavaju kronični upalni proces. Visoke koncentracije citokina IL-17 i IL-23 utvrđene su u različitim autoimunim bolestima, primjerice MS, reumatoidni artritis (RA, prema engl. *rheumatoid arthritis*) i psorijazi (24).

#### **1.1.3.5. Značajke imunološkog odgovora limfocita Th u multiploj sklerozi**

Nasuprot klasične patogenetske uloge limfocita Th1 u tkivno-specifičnim autoimunim bolestima, niz pokusa na životinjskim modelima dokazuje ključnu važnost limfocita Th17 u MS, dok pri tome limfociti Th1 imaju zaštitnu ulogu (31). Posebice se u eksperimentalnim modelima proučavalo djelovanje citokina IL-12 i IL-23, koji dijele zajedničku podjedinicu p40, uz specifične podjediničice p35 za IL-12 i p19 za IL-23, a važni su za diferencijaciju tih limfocitnih subpopulacija. U modelu EAE, infiltracija limfocitima Th17 prethodi kliničkom razvoju bolesti. Usporedo se unutar središnjeg živčanog sustava aktiviraju stanice mikroglije CD11b<sup>+</sup>, uz lokalno lučenje citokina IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i IL-6. Značajna infiltracija limfocitima Th1 odvija se tek nakon razvoja kliničkih znakova bolesti. Nađeno je, također, da u kokulturi stanica mikroglije i limfocita T specifičnih za mijelinski bazični protein (MBP, prema engl. *myelin basic protein*), limfociti Th17 mnogo potentnije induciraju proupalne citokine od limfocita Th1, premda obje subpopulacije limfocita Th pojačavaju izražaj molekula MHC II i kostimulacijskih molekula na membrani stanica mikroglije (32).

Mišji modeli pokazuju da TGF- $\beta$  zajedno s IL-6 potiče polarizaciju naivnih limfocita T prema limfocitima Th17, čija ekspanzija dovodi do egzacerbacija EAE, što je u suprotnosti s češće opisivanim protuupalnim djelovanjem citokina TGF- $\beta$ . Pretpostavlja se da u fiziološkim uvjetima, kada nema upalnog mikrookoliša, TGF- $\beta$  kojeg luče stanice imunološkog sustava koči efektorske autoreaktivne limfocite T održavajući imunotoleranciju. U stanjima upale i infekcije, proupalni citokin IL-6, kojeg luče stanice nespecifičnog imunološkog odgovora, koči razvoj regulatornih limfocita T i potiče proupalni imunološki T stanični odgovor

dominantno posredovan limfocitima Th17. Taj antagonizam je posebice važan za tumačenje patogeneze autoimunih bolesti i uloge kronične upale u autoimunom procesu. Nadalje, dokazano je da se broj limfocita Tregs ne mijenja značajno u odnosu na kontrolnu skupinu u perifernim odjeljcima imunološkog sustava u modelu EAE, ali da u središnjem živčanom sustavu postoji značajna razlika u broju i aktivnosti tih stanica u odnosu na kontrolnu skupinu, što je u korelaciji s kliničkom prezentacijom bolesti. U središnjem živčanom sustavu broj limfocita Th17 povećava se s aktivnošću EAE, a značajno se smanjuje za vrijeme oporavka. Tijekom razvoja EAE mijelinsko-specifični limfociti Tregs ciljano se nakupljaju u strukturama središnjeg živčanog sustava, dok se s regresijom kliničkih simptoma broj mijelinsko-specifičnih limfocita Tregs značajno smanjuje. Štoviše, postoji značajna povezanost između kliničke slike EAE te odnosa broja limfocita Tregs i Th17 u središnjem živčanom sustavu, ali ne i u perifernim limfnim tkivima. Limfociti Tregs u središnjem živčanom sustavu pretežno stvaraju IL-10, protuupalni citokin čija je koncentracija u negativnoj korelaciji s kliničkim tijekom bolesti (33).

I u bolesnika koji boluju od MS istraživana je uloga limfocita Tregs i Th17. Pokazane su povišene koncentracije citokina IL-17 u demijelinizacijskim plakovima i cerebrospinalnom likvoru (34). Stanice mikroglije mogu djelovati kao predočne stanice (APC, prema engl. *antigen presenting cells*) te kao izvršne stanice uključene u proces upalne demijelinizacije središnjeg živčanog sustava. IL-17 u tim stanicama potiče izražaj proupalnih molekula, uključujući IL-6, dušikov oksid (NO, prema engl. *nitric oxid*), različite neutrofilne kemotaksijske čimbenike i adhezijske molekule, što potvrđuje ulogu limfocita Th17 u patogenezi MS (35). Limfocitni infiltrat na mjestima lezija sastoji se poglavito od limfocita Th1 i Th17. Ukoliko u infiltratu dominiraju limfociti Th17, razvija se upalni proces zbog pojačanog lučenja IL-17. IL-17 je ključan za pokretanje autoimune reakcije u središnjem živčanom sustavu jer potiče aktivaciju enzima MMP3 te privlači neutrofile na mjestu upale.

Neutrofilna aktivacija te druge vrste metaloproteinaza, proteaza i gelatinaza narušavaju selektivnu permeabilnost krvno-moždane barijere i dodatno povećavaju neutrofilnu infiltraciju. Povećana aktivnost proteaza privlači značajan broj monocita/makrofaga na mjesto upale što dovodi do oštećenja mijelina i aksona. Nasuprot tome, u leđnoj moždini se upalna reakcija razvija kada dominiraju limfociti Th1 u odnosu na limfocite Th17, upućujući na zaključak da su za autoimunu upalu u mozgu važniji limfociti Th17, a u leđnoj moždini limfociti Th1 (36).

Uz promjene subpopulacija Th1 i Th17, u MS su uočene promjene u djelovanju limfocita Tregs. Bolesnici koji boluju od MS nemaju značajnu razliku u broju limfocita Tregs u odnosu na zdrave ispitanike, ali u *in vitro* pokusima dokazana je supresija njihove funkcije (37). Prema izražaju membranskog receptora za programiranu smrt (PD-1, prema engl. *programmed cell death protein 1*), limfociti Tregs dijele se na naivne i memorijske, a njihov broj promijenjen je u bolesnika koji boluju od MS (38,39).

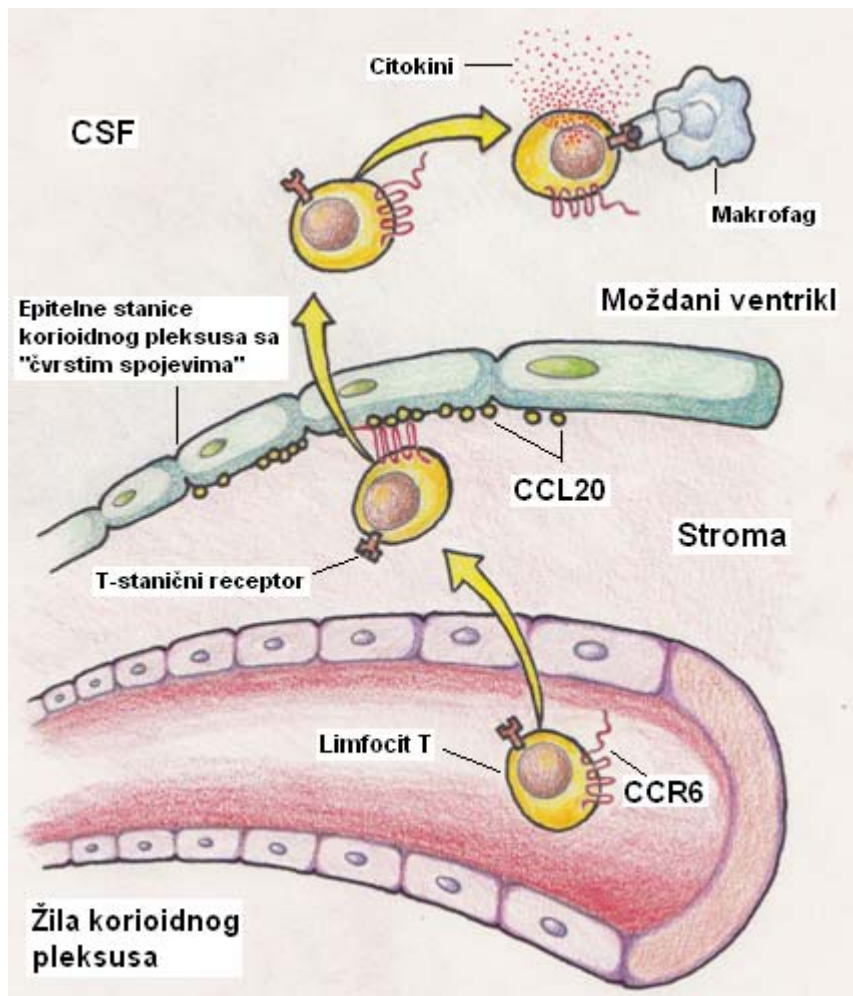
No i dalje se u patogenezi MS uz limfocite Th17 i Tregs ističe važnost limfocita Th1, poglavito zbog proupalnog djelovanja i poticanja mononuklearne infiltracije. Uz pomagačke limfocite T CD4<sup>+</sup>, u patogenezi MS važni su i citotoksični limfociti T CD8<sup>+</sup>. Citotoksični limfociti T pretežito se nalaze perivaskularno u bijeloj tvari za razliku od pomagačkih limfocita T naseljenih na periferiji demijelinizacijskih lezija. MS je karakterizirana velikom varijabilnošću lokalizacije lezija u središnjem živčanom sustavu, što je povezano s tkivnom distribucijom molekula MHC, pa mijelin-specifični limfociti T, unatoč tome što je MBP široko zastupljen u moždanom tkivu, ne infiltriraju cijeli moždani parenhim već samo određena mjesta gdje stvaraju demijelinizacijske plakove (40,41).

#### **1.1.4. Etiologija i patogeneza multiple skleroze**

Etiologija i patogeneza MS još uvijek nisu potpuno razjašnjene, ali novije studije upućuju na združeno djelovanje nekoliko čimbenika, uključujući imunološke procese, virusne i neke druge infekcije te okolišne i genetske čimbenike.

##### **1.1.4.1. Molekularna mimikrija u multiploj sklerozi**

S obzirom na autoimunu etiologiju, postavljena je hipoteza o molekularnoj mimikriji kao imunopatogenom čimbeniku bolesti. Molekularna se mimikrija javlja kada peptidi patogena, virusa ili bakterije, strukturalno sličie autoantigenima (*križna reaktivnost*). Infekcija različitim patogenima, čija molekularna struktura nalikuje antigenima središnjeg živčanog sustava, može posredovati *križnu reaktivnost*, ali niti za jedan određeni patogen nije dokazana uzročna povezanost. Molekularna mimikrija ovisi i o fenotipu molekula MHC skupina I i II, a da bi se bolest potaknula uz molekulanu mimikriju važna je i aktivacija nespecifičnog imunološkog odgovora (42).



**Slika 2. Migracija limfocita T u tkivo središnjeg živčanog sustava u pokusnom modelu autoimunog encefalomijelitisa.** Memorijski limfociti koji izražavaju molekulu CCR6 izlaze iz žila koroidnog pleksusa u podležću tkivnu stromu, a nakon toga migriraju prema epitelnim stanicama koroidnog pleksusa koje izražavaju kemoatrakcijsku molekulu CCL20. CCL20 signalizacija preko molekule CCR6 omogućuje limfocitima T prolazak preko “čvrstih spojeva” između epitelних stanica koroidnog pleksusa (krvno-moždana barijera) i ulazak u moždane ventrikle, odakle navedene stanice migriraju u subarahnoidalni prostor. Restimulacija tih limfocita T makrofagima u subarahnoidalnom prostoru dovodi do proizvodnje različitih citokina, povećanja broja limfocita T i stimulaciju krvno-moždane vaskulature, što potiče drugi val upalne stanične invazije središnjeg živčanog sustava. Eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis (EAE; prema engl. *experimental autoimmune encephalomyelitis*); CCL, kemokin CC; CXCL, kemokin CXC, CCR, receptor za kemokin CC. Modificirano prema: Ranshoff RM. Immunology: In the beginning. Nature. 2009 Nov 5;462(7269):41-2.

#### 1.1.4.2. Propusnost krvno-moždane barijere u multiploj sklerozi

Prelazak leukocita u središnji živčani sustav predstavlja ključni korak u tijeku MS, no okidač toga procesa još nije potpuno razjašnjen (Slika 2). Aktivirani limfociti Th1 ulaze u središnji živčani sustav, te se reaktiviraju prepoznavanjem autoantigena (mijelinskih proteina) na stanicama makrofaga i mikroglije.

U ranoj fazi bolesti krvno-moždana barijera postaje propusna, što se prikazuje magnetskom rezonancom uz upotrebu Gd (prema lat. *gadolinium*)-kontrasta. Imbibicija kontrastom u novonastalim oštećenjima središnjeg živčanog sustava znak je propusnosti krvno-moždane barijere. Važan čimbenik u povećanju propusnosti krvno-moždane barijere jest citokin IL-13 kojeg luče aktivirani makrofagi i mikroglija, a može potaknuti astrocite na lučenje drugih čimbenika, primjerice vaskularnog endotelnog čimbenika A (VEGF-A, prema engl. *vascular endothelial growth factor A*) koji dodatno povećava propusnost krvno-moždane barijere (10).

Leukociti prelaze u središnji živčani sustav kroz endotelne stanice na nekoliko načina: stvaranjem pora, transcelularnom dijapedezom, koja je slična fagocitozi te paracelularnom dijapedezom, između endotelnih stanica (43).

U fiziološkim uvjetima, aktivirani limfociti T u malom broju prolaze krvno-moždanu barijeru, no ne vežu se na endotelne stanice zbog razmjerno slabog izražaja staničnih adhezijskih molekula (CAM, prema engl. *cell adhesion molecules*). Molekule CAM zaslužne su za privlačenje i vezanje leukocita na endotelne stanice (44). Endotelne stanice, aktivirane citokinima, primjerice TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-22 i IL-1 $\beta$  pojačano izražavaju molekule CAM koje dalje regrutiraju leukocyte pokrećući upalnu kaskadu. U MS i EAE dokazan je pojačan izražaj molekula CAM, uključujući ICAM-1/CD54 (prema engl. *intercellular adhesion molecule 1/CD54*), VCAM-1/CD106 (prema engl. *vascular adhesion molecule 1/CD106*) i ALCAM/CD166 (prema engl. *activated leukocyte adhesion molecule/CD166*). U



svladavanju longitudinalnih sila krvnog protoka važno je i međustanično djelovanje posredovano selektinima. Tako leukociti izražavaju L-selektin, a aktivirani endotel E- i P-selektine, dok obje vrste stanica izražavaju integrin VLA4 (prema engl. *very late antigen 4*). Djelovanjem tih signala leukociti sporo kližu po površini žile u smjeru protoka krvi, zaustavljajući se u određenom trenutku (45).

Uz navedene citokine, i neki kemokini potiču aktivaciju limfocita T i prijelaz krvno-moždane barijere. U neuroinflamatornim procesima uočen je pojačan izražaj kemokina CCL19/ELC (prema engl. *C-C motif ligand 19/EBI1 ligand chemokine*) i CCL21/SLC (prema engl. *C-C motif ligand 21/secondary lymphoid-tissue chemokine*). U MS i EAE ti kemokini posreduju aktivaciju limfocita T i predočnih stanica koje izražavaju receptor CCR7 (prema engl. *C-C motif receptor 7*). Uz to, *in vitro* je pokazano da endotelne stanice moždanog tkiva pojačano izlučuju CXCL10 i CXCL8 (prema engl. *C-X-C motif ligand*), što pridonosi polarizaciji prema upalnom odgovoru Th1 u MS (46).

#### **1.1.4.3. Imunološki odgovor u multiploj sklerozi**

U MS se opisuju četiri oblika imunoloških mehanizama koji uzrokuju demijelinizaciju. Tip I je posredovan limfocitima T, u kojem demijelinizaciju posreduju aktivirani makrofagi, izravnim djelovanjem i lučenjem citoksina. Najčešći patološki oblik MS je tip II koji uključuje limfocite T i protutijela, a demijelinizacija je uzrokovana djelovanjem specifičnih protutijela i aktivacijom komplementa. U tipu III nalazimo distalnu oligodendropatiju jer se degenerativne promjene nalaze u distalnim nastavcima oligodendrocita koji kasnije odumiru apoptozom. Tip IV nastaje primarnim oligodendrocitnim oštećenjem i sekundarnom demijelinizacijom (47).

#### 1.1.4.4. Infektivni čimbenici u patogenezi multiple skleroze

Infekcije, u prvom redu virusne, mogu imati ulogu u patogenezi MS mehanizmima koji uključuju molekularnu mimikriju te promjene genoma uzrokovane virusima. Osim toga, poticanju autoimunosti prilikom virusne infekcije pridonosi i mehanizam *širenja epitopa* (prema engl. *epitope spreading*), proces tijekom kojega upalna reakcija na epitope MBP potiče daljnje prepoznavanje drugih epitopa istoga proteina (48).

S patogenezi MS povezuju se i infekcije virusom *Epstein-Barr*, citomegalovirusom i virusom gripe. Svi ti virusi mogu *per se* uzrokovati demijelinizaciju, najčešće u obliku kliničke slike postinfekcijskog encefalomijelitisa, subakutnog sklerozirajućeg panencefalitisa, koji se povezuju i s infekcijom virusom ospica te progresivnu multifokalnu encefalopatiju, koja se povezuje s virusima *Papova* (49).

#### 1.1.4.5. Okolišni čimbenici u patogenezi multiple skleroze

Okolišni čimbenici pridonose patogenezi MS, a posebice se ističe geografska širina. Već je spomenuto da se rizik razvoja MS povećava sjevernije ili južnije od Ekvatora, moguće uzorkovano manjkom vitamina D zbog slabije insolacije (50). Vitamin D pripada skupini solubilnih sekosteroida i, uz paratireoidni hormon, važan je u metabolizmu kalcija jer regulira koncentraciju kalcija u krvi djelovanjem na koštanu razgradnju i bubrežno izlučivanje kalcija. Važna je također i njegova imunoregulacijska funkcija. *In vitro*, modulira imunološki odgovor inhibirajući lučenje proupalnih citokina odgovora Th1, u isto vrijeme potičući limfocite Th2 (51). U središnjem živčanom sustavu, posredovanjem stanica mikroglije, blokira stvaranje proupalnih citokina i NO. Uz to, važan je za regulaciju neurotransmitske i neuralne funkcije. Novija istraživanja pokazuju da sudjeluje i u regulaciji procesa

demijelinizacije i potencijalne remijelinizacije, zaustavlja oligodendrocitnu apoptozu i potiče diferencijaciju oligodendrocitnih progenitora u zrele stanice (52).

Uz geografski položaj i pušenje predstavlja rizični čimbenik za razvoj MS (53). Bolesnici koji puše ili su pušili imaju povišen fibrinogen, CRP (prema engl. *C-reactive protein*) i proupalne citokine, primjerice IL-6, a uz to podložniji su respiratornim infekcijama koje su važan okidač relapsa u MS (54).

#### **1.1.4.6. Genetski čimbenici u patogenezi multiple skleroze**

Određeni geni, posebice MHC, povezani su s razvojem MS. Pojedine alelne varijante gena MHC, odnosno HLA (prema engl. *human leukocyte antigen*), na kromosomu 6p21 određuju rizik razvoja MS, posebice geni skupine II. U predjelu lezija dokazan je izražaj molekula skupine II DR15 i DQ6, dok zaštitni čimbenik predstavljaju molekule skupine I C554 i skupine II DRB1-11. Najveći rizik obolijevanja nosi molekula HLA-DR2, zbog učinkovitosti predočavanja antigena, a povezana je s razvojem RR-MS i primarno-progresivne (PP, prema engl. *primary progressive*) MS.

No bez obzira na dokazane povezanosti, pojedini HLA-haplotipovi samo povećavaju rizik obolijevanja u okviru poligenetskog obrasca patogenetskih čimbenika, a ne znače nužno razvoj bolesti. Na epidemiološkoj razini rizik obolijevanja veći je među srodnicima bolesnika nego u općoj populaciji, a posebice je veći u roditelja, braće, sestara i potomaka oboljelih. Kod jednojajčanih blizanaca rizik obolijevanja je 25%, dok je kod dvojajčanih blizanaca 2,5%. Činjenica da jednojajčani blizanci ne obolijevaju nužno dokazuje da bolest nije isključivo genetski uvjetovana (5,10,55).

### **1.1.5. Cerebrospinalni likvor u bolesnika koji boluju od multiple skleroze**

U bolesnika cerebrospinalni je likvor bezbojan i proziran, uz većinom normalan broj stanica (do 100 stanica/mm<sup>3</sup>) i koncentraciju bjelancevina (do 100 mg/dL). Čak i tijekom egzacerbacije bolesti, broj stanica je normalan ili pokazuje blagu pleocitozu. No značajno je da su koncentracije imunoglobulina IgG, odnosno indeks IgG, povišeni u 75-85% bolesnika, zbog intratekalne sinteza IgG koji ima abnormalan elektroforetski profil, nazvan *oligoklonske vrpce* koje su znak intratekalne sinteze određenog podrazreda IgG. Fiziološki, u cerebrospinalnom likvoru nalazimo više od 400 različitih vrsta proteina, pa se određivanjem proteinskog profila u bolesnika nastoje utvrditi markeri tijeka bolesti. Uz proteinski, u tijeku su istraživanja lipidog i nukleinskog profila cerebrospinalnog likvora bolesnika (56,57).

#### **1.1.5.1. Markeri upale u cerebrospinalnom likvoru bolesnika**

Proteinski profil topljivih posrednika upale, posebice citokina IL-1, IL-12, TNF- $\alpha$ , interferona, IL-10 i TGF- $\beta$ , promijenjen je u bolesnika, ali čvrsta korelacija sa znakovima aktivnosti bolesti, prije svega radiološkim nalazom magnetske rezonance te njihova klinička važnost kao pokazatelja tijeka bolesti i prognoze još nije jasno utvrđena (58).

#### **1.1.5.2. Markeri demijelinizacije u cerebrospinalnom likvoru bolesnika**

Prisutnost multilamelarnih mijelinskih fragmenata vidljivih u uzorcima ultracentrifugiranog sedimenta cerebrospinalnog likrova analiziranim elektronskim mikroskopom u egzacerbaciji bolesti uputila je na važnost mijelinskih proteina kao mogućih markera demijelinizacije (59). Najviše je istražen protein MBPL (prema engl. *MBP-like material*) koji je povišen u 80% bolesnika u egzacerbaciji RR-MS pa se koncentracija MBPL u cerebrospinalnom likvoru može rabiti za dokazivanje kliničkog relapsa. Vrijednosti ostaju

povišene 4-6 tjedana nakon egzacerbacije, ali fiziološke koncentracije ne isključuju egzacerbaciju. Dokaz egzacerbacije, naravno, moguć je kontrastnom neuroradiološkom dijagnostikom, prvenstveno magnetskom rezonancom (60).

## **1.2. Kliničke značajke multiple skleroze**

Premda MS može zahvatiti bilo koji dio središnjeg živčanog sustava, u kliničkoj praksi neka su mjesta češće zahvaćena. Također, neki čimbenici povećavaju rizik pojave relapsa. Tako su relapsi češći u proljeće i ljeto (61). Uz to, virusne infekcije (primjerice prehlada, gripa ili gastrointestinalne infekcije) i općenito, stresna stanja povećavaju rizik pojave relapsa. Smanjena učestalost relapsa zamijećena je tijekom trudnoće, a povećava se unutar prva tri mjeseca nakon rođenja djeteta (5).

### **1.2.1. Simptomi i znakovi bolesti**

Zbog složene patogeneze, MS nije jedinstvena u svojem nastupu, tijeku, kliničkoj slici i prognozi kod svakog bolesnika. Obzirom da MS može oštetiti gotovo svaki dio središnjeg živčanog sustava, bolesnici razvijaju različite simptome, a najčešće se javljaju znaci oštećenja piramidnih, osjetnih, vidnih i autonomnih puteva (5). Najčešće bolest započinje unutar nekoliko dana kao klinički izolirani sindrom (CIS, prema engl. *clinically isolated syndrome*) s piramidnim i osjetnim simptomima (u 45% bolesnika). Može započeti i kao optički neuritis (u 20% bolesnika), a u malog broja bolesnika započinje zahvaćanjem moždanog debla (u 10% bolesnika). Preostalih 25% bolesnika ima kod prve pojave bolesti oštećeno više od jednog sustava (62). Nastup simptoma u daljnjem tijeku bolesti (nakon prve kliničke manifestacije) naziva se relaps ili egzacerbacija, a rijetko se javlja više od dva puta godišnje. Simptomi su određeni mjestom oštećenja središnjeg živčanog sustava pa na temelju toga razlikujemo specifične kliničke entitete.

Stupanj oštećenja neuroloških funkcija u bolesnika koji boluju od MS mjeri se *Kurtzkeovom ljestvicom*, odnosno proširenom ljestvicom stupnja oštećenja (EDSS, prema engl. *expanded disability status scale*) (63). Njome se kvantitativno procjenjuje stupanj kliničkog oštećenja pojedinih neuroloških funkcionalnih sustava, uključujući piramidni sustav, mali mozak, moždano deblo, osjetni sustav, sustav inervacije analnog i mokraćnog sfinktera, vidni sustav i kognitivna neuralna mreža.

#### **1.2.1.1. Optički neuritis**

Bolesnici se žale na gubitak vida ili ispad vidnog polja, većinom na jednom oku. Tipično, započinje bolnošću zahvaćenog oka, potenciranoj kretanjem očnog bulbusa. Osobito je zahvaćen modalitet vida za boje pa bolesnici često slabije vide jarko crvenu boju (*diskromatopsija*). Važno je istaknuti da nemaju svi bolesnici s optičkim neuritisom MS, ali je prediktivno da će 30% bolesnika koji se prezentiraju optičkim neuritisom unutar 5 godina razviti drugi neurološki ispad koji će zadovoljiti kriterije dijagnoze MS (64).

#### **1.2.1.2. Piramidni simptomi**

Većina bolesnika koji boluju od MS napredovanjem bolesti razvija znakove oštećenja piramidnih puteva pa se tako od simptoma javlja otežan hod (zbog spastičke parapareze i ataksije donjih udova) te grčevi u nogama po spastičkom tipu. Uz to, javljaju se i lateralizirajuće slabosti udova određene strane tijela, odnosno spastičke hemipareze. Ti simptomi mogu nastati naglo ili se mogu javiti postupno unutar nekoliko tjedana. Bolesnici koji se jave samo sa znacima transverzalnog mijelitisa, odnosno parapareze ili monopareze donjeg uda uz urednu magnetsku rezonancu mozga, razviju MS u 25% slučajeva, a bolest pokazuje progresiju kroz 10 godina u 67% bolesnika (5, 10).

### 1.2.1.3. Osjetni simptomi

*Lhermitteov znak* istezanja stražnjih kolumni, koji se očituje osjećajem poput “*udara struje*”, kroz kralježnicu i prema udovima kod antefleksije glave, premda nije patognomoničan za MS, jedan je od prvih i najupečljivijih znakova prilikom pregleda bolesnika. Uz to, redovito se javljaju i parestezije koje bolesnici opisuju kao “*obruč*” oko prsa, trbuha, udova i zdjelice, a odraz su malih demijelinizacijskih plakova u leđnoj moždini. Vrlo su česte i dizestezije te hipoestezije udova (5, 10).

### 1.2.1.4. Ostali simptomi

*Dvoslike:* Kod mlade osobe kod koje dvoslike traju nekoliko dana ili tjedana vrlo je suspektna MS. Najčešći znak kod pregleda bulbomotorike je internuklearna oftalmoplegija, a posljedica je oštećenja medijalnog longitudinalnog fascikulusa u području moždanog debla. Bilateralna oftalmoplegija je gotovo patognomonična za MS.

*Kognitivno-bihevioralne promjene:* Mnogi bolesnici zamjećuju oštećenje kognitivnih funkcija i poremećaje raspoloženja. Najčešće kognitivne smetnje su otežana koncentracija, odsutnost, smanjena verbalna fluentnost i psihomotorno usporenje. Ove smetnje mogu se javiti na početku bolesti, ali i u kasnijim fazama. Također, prevalencija depresije je veća u populaciji bolesnika koji boluju od MS.

*Inkoordinacija:* Ataksija je vrlo česta, a u nekih bolesnika trunkalna ataksija je tako snažno izražena da onemogućuje čak i samostalno sjedenje.

*Govor:* Zbog zahvaćenosti maloga mozga i pripadajućih puteva bolesnici razvijaju skandirani govor, a zahvaćanje ostalih moždanih centara zaduženih za govor dovodi do dizartrije i zamjene slogova u riječima.

*Urinarna inkontinencija:* Vrlo je čest simptom MS (80-90% bolesnika), a najčešći oblik je urgentna inkontinencija, premda se može razviti i urinarna retencija.

Paroksizmalni simptomi: Nagla pojava dizatrije, ataksije, spazama ili vrtoglavice mogu biti prvi simptomi MS osobito u mlađih osoba.

Vrtoglavica: Simptom traje nekoliko dana, često praćen drugim simptomima oštećenja moždanog debla, primjerice nistagmusom, senzornim ispadima na licu ili unilateralnom gluhoćom.

Umor: Redovit je simptom koji ne mora korelirati s aktivnošću bolesti, a najčešći je razlog zbog kojega bolesnici napuštaju posao.

Bol: Javlja se u 90% bolesnika i sve se češće prepoznaje kod inicijalnog pregleda. Dijeli se u paroksizmalnu (trigeminalna neuralgija), neurogenu (osjećaj utrnulosti ili žarenja) i muskuloskeletalnu (bol u kompenzirajućoj zdravoj strani kod hemipareze)

Spasticitet: Povišen tonus mišića kod mirovanja znak je oštećenja piramidnog puta (5,10).

### **1.2.2. Klinički oblici multiple skleroze**

Bolesnici mogu razviti nekoliko različitih kliničkih oblika bolesti (RR-MS, PP-MS, SP-MS i benigni oblik). Uz MS, postoje i drugi oblici demijelinizirajućih bolesti središnjeg živčanog sustava, uključujući optički neuromijelitis (*Morbus Devic*), *Schilderovu* difuznu sklerozu, *Marburgovu* sklerozu i *Baloovu* koncentričnu sklerozu, koje neki smatraju oblicima MS.



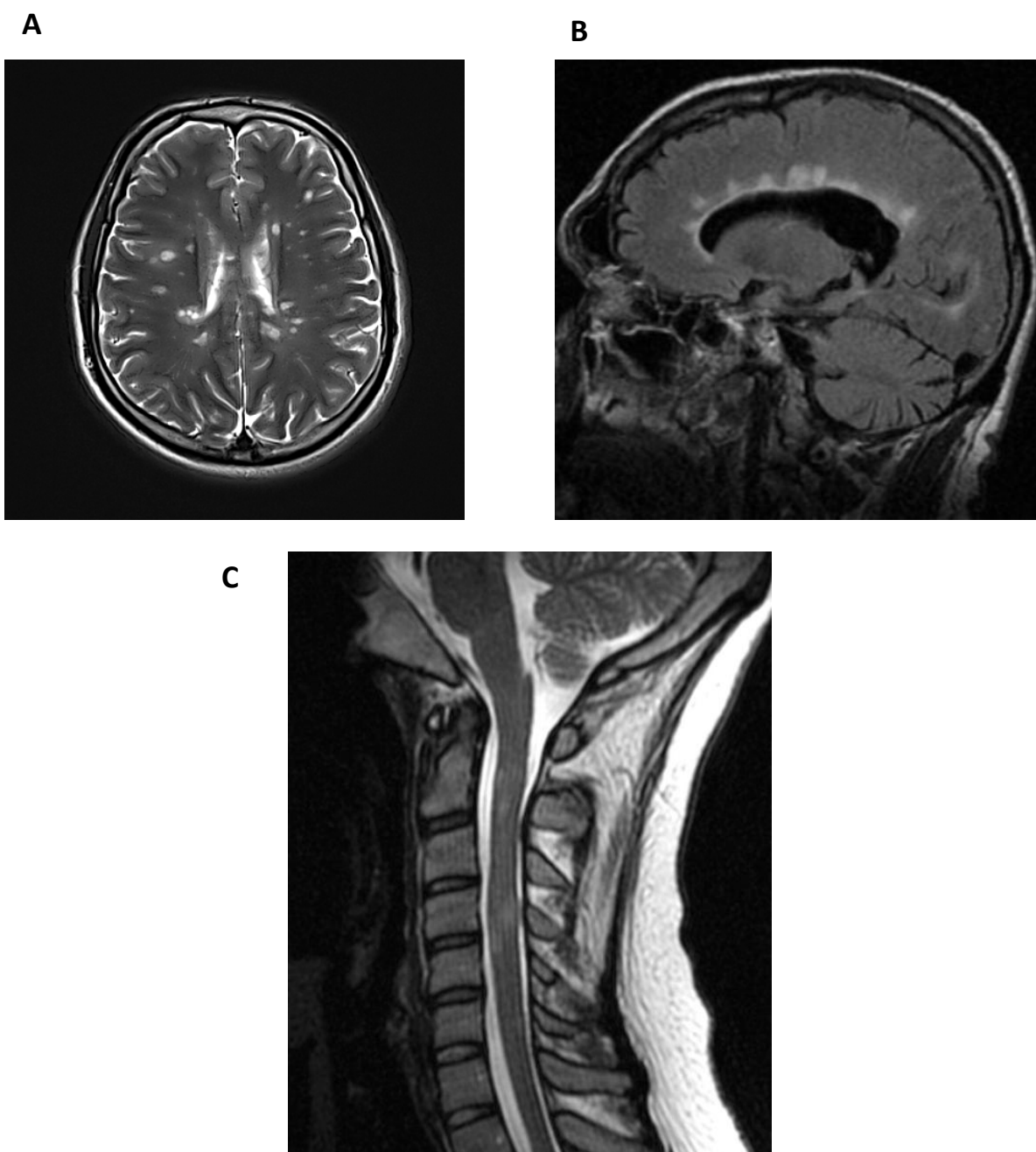
**Tablica 1. Klinički oblici multiple skleroze**

Klinički oblik MS	Opis
<b>1. Relapsno-remitirajući (RR-MS)</b>	Najčešći s 80% pojavnosti, a karakterizira ga nepredvidiva pojava relapsa nakon kojeg slijedi razdoblje remisije bez znakova aktivnosti bolesti. Neurološki ispadi koji se jave za vrijeme relapsa mogu potpuno nestati, no češće ostavljaju neurološko oštećenje koje do relapsa nije bilo vidljivo.
<b>2. Primarno-progresivni (PP-MS)</b>	Javlja se u 10-20% bolesnika, a karakterizira ga izostanak remisije nakon relapsa; bolest ima stabilan progresivni tijek od samog početka.
<b>3. Sekundarno-progresivni (SP-MS)</b>	Javlja se unutar 6-10 godina u 30-40% bolesnika koji započnu kao RR-MS, a zatim razviju progresivni tijek bez remisija.
<b>4. Benigni</b>	Sličan je obliku RR-MS, ali između relapsa nema rezidualnog neurološkog deficita ili je on vrlo diskretan.

### 1.2.3 Radiološke značajke multiple skleroze

Magnetska rezonanca je uz kliničku sliku ključni instrument u dijagnosticiranju MS obzirom na dijagnostički kriterij dokaza prostorne i vremenske diseminacije demijelinizacijskih lezija. Za postavljanje dijagnoze MS na temelju magnetske rezonance postoji standardizirani protokol koji uključuje sagitalne snimke u standardnim sekvencama sa supresijom signala tekućine, aksijalne snimke protonske gustoće (prema engl. *proton density*), snimke u T2-vremenu i aksijalne snimke u T1-vremenu nakon aplikacije Gd-kontrasta. Posebice su značajne kontrastne (*post-Gd*) snimke u T1-vremenu, ukoliko su suspektne lezije vidljive protokolom standardnim sekvencama sa supresijom signala tekućine (65). Post-Gd snimke važne su i stoga što pokazuju mjesta oštećenja krvno-moždane barijere jer Gd-kontrast ne može proći iz krvi u mozak preko zdrave krvno-moždane barijere.

Prisutnost samo jedne lezije vidljive magnetskom rezonancom nije patognomonična za bolest, ali određene distribucije i tipovi lezija su visoko suspektne za MS. Posebno su dijagnostički značajne perpendikularne, poput „*jezičaca vatre*“, oblikovane lezije korpusa kalozuma (*Dawsonovi prsti*), jukstakortikalne lezije te lezije moždanog debla. Uz njih, za dijagnozu su važne i lezije u leđnoj moždini koje valja razlikovati od longitudinalnog ekstenzivnog transverznog mijelitisa (prisutnog u optičkom neuromijelitisu), koji zahvaća tri ili više segmenata leđne moždine. U MS, po definiciji, transverzalni mijelitis zahvaća manje od tri segmenta leđne moždine. Valja naglasiti da je heterogenost lezija važna osobina MS (Slika 3). Nalaz razmjerno malih supkortikalnih lezija smještenih u vanjskoj kapsuli i dubokom dijelu bijele tvari, bez zahvaćanja korpusa kalozuma, više upućuje na bolest malih krvnih žila nego na MS (5,10).



**Slika 3. Izgled demijelinizacijskih lezija u središnjem živčanom sustavu bolesnika koji boluju od multiple skleroze prikazan magnetskom rezonancom.** A) Transverzalni presjek kroz mozak koji prikazuje periventrikularne i jukstakortikalne lezije te lezije u bijeloj moždanoj tvari. B) Sagitalni presjek kroz mozak koji prikazuje periventrikularne lezije, tipično “Dawsonove prste”. C) Sagitalni presjek kroz infratentorijske strukture te vratni dio leđne moždine koji prikazuje nekoliko demijelinizacijskih lezija moždine na razinama drugog i četvrtog vratnog kralješka. Modificirano prema fotografijama sa stranice [www.radiopaedia.org](http://www.radiopaedia.org).

#### **1.2.4. Dijagnostički kriteriji za postavljanje dijagnoze multiple skleroze**

Danas su za postavljanje dijagnoze MS važeći revidirani *McDonaldovi kriteriji* iz 2010. godine (66), koji se baziraju na kliničkim i parakliničkim kriterijima te na diseminaciji bolesti u prostoru i vremenu. Postavljeni su su 2001. godine, revidirani 2005. i 2010. godine, a predlažu definicije: MS, suspektne MS i isključenje MS. Zamijenili su *Poserove* i još starije *Schumacherove* kriterije.

#### **1.2.5. Liječenje multiple skleroze**

Suvremeni protokoli liječenja MS razlikuju se s obzirom na kliničku formu i stupanj aktivnosti bolesti, a poglavito uključuju glukokortikode te različite bolest-modificirajuće lijekove, uključujući IFN- $\beta$ , glatiramer-acetat, mitoksantron i natalizumab (69-71).

##### **1.2.5.1. Liječenje relapsa**

Tijekom relapsa visoke doza intravenskih glukokortikoida, primjerice metilprednizolona, u dozi 500-1.000 mg/dan kroz tri do pet dana, predstavljaju uobičajenu terapiju prvog izbora, a ovakva vrsta liječenja još se naziva i “pulsna terapija glukokortikoidima” (5). Oralni glukokortikoidi imaju sličnu učinkovitost i sigurnost primjene te se daju u ekvivalentnim dozama kao i intravenski glukokortikoidi (69). Relapse teže kliničke slike, koji ne odgovaraju na terapiju glukokortikoidima, može se liječiti plazmaferezom (5).

**Tablica 2. Revidirani McDonaldsovi kriteriji iz 2010. godine**

<b>Klinička slika</b>	<b>Dodatne informacije<sup>a</sup></b>
<b>Dva ili više napadaja (relapsa) i dvije ili više objektivne kliničke lezije.</b>	
<b>Dva ili više napadaja (relapsa) i jedna objektivna klinička lezija.</b>	<p>Diseminacija u prostoru vidljiva sljedećim pokazateljima:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- MR</li> <li>- ili pozitivan nalaz u CSL (pozitivne OKV i/ili povišen IgG indeks) i 2 ili više lezije na MR koje su po distribuciji tipične za MS</li> <li>- ili sljedeći klinički relaps koji zahvaća drugo mjesto</li> <li>- prisutnost 1 ili više lezija vidljivih u T2 vremenu u najmanje 2 od 4 sljedeća područja mozga: periventrikularno, jukstakortikalno, infratentorijalno ili u leđnoj moždini.</li> </ul>
<b>Jedan napadaj (relaps) i dvije ili više objektivnih kliničkih lezija.</b>	<p>Diseminacija u vremenu vidljiva sljedećim pokazateljima:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- MR</li> <li>- ili sljedeći klinički relaps</li> <li>- bez potrebe snimanja više MR što omogućuje bržu dijagnozu bez da se žrtvuje specifičnost, a poboljšavajući osjetljivost. Simultana prisutnost asimptomatskih Gd-imbibiranih i Gd-neimbibiranih lezija bilo kada u tijeku bolesti; ili novootkrivena lezija u T2 vremenu i/ili Gd-imbibirana lezija na kontrolnom MR, bez obzira na vrijeme u odnosu na inicijalnu snimku; ili pričekati sljedeći relaps.</li> </ul>
<b>Jedan napadaj (relaps) i jedna objektivna klinička lezija (CIS, klinički izolirani sindrom).</b>	<p>Diseminacija u prostoru i vremenu vidljiva sljedećim pokazateljima:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- diseminacija u prostoru - jedna ili više lezija u T2 vremenu u najmanje 2 od 4 za MS tipične regije središnjeg živčanog sustava (periventrikularna, jukstakortikalna, infratentorijalna i u leđnoj moždini); ili pričekati sljedeći relaps koji bi implicirao drugo mjesto u središnjem živčanom sustavu.</li> <li>- diseminacija u vremenu - simultana prisutnost asimptomatskih Gd-imbibiranih i Gd-neimbibiranih lezija bilo kada u tijeku bolesti; ili novootkrivena lezija u T2 vremenu i/ili Gd-imbibirana lezija na kontrolnom MR, bez obzira na vrijeme u odnosu na inicijalnu snimku; ili pričekati sljedeći relaps.</li> </ul>
<b>Podmukla neurološka progresija koja je suspektna na MS (PP-MS).</b>	<p>Jednogodišnja progresija bolesti (određena retrospektivno ili prospektivno) te 2 od 3 kriterija:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- dokaz diseminacije u prostoru u mozgu koji se temelji na jednoj ili više lezija u T2 vremenu u regijama karakterističnim za MS (periventrikularne, jukstakortikalne i infratentorijalne)</li> <li>- dokaz diseminacije u vremenu u leđnoj moždini temeljenu na dvije ili više lezija u T2 vremenu</li> <li>- pozitivan nalaz u CSL (pozitivne OKV i/ili povišeni IgG indeks).</li> </ul>

<sup>a</sup> MR - magnetska rezonanca; CSL - cerebrospinalni likvor; OKV - oligoklonalne vrpce.

### 1.1.5.2. Bolest-modificirajuća terapija

RR-MS: Trenutno je osam lijekova odobreno za liječenje RR-MS: IFN- $\beta$ 1a, IFN- $\beta$ 1b, glatiramer-acetat, mitoksantron, natalizumab, fingolimod, teriflunomid i dimetil-fumarat (70,71). Ti su lijekovi umjereno učinkoviti u smanjenju broja napadaja (71). Interferoni i glatiramer-acetat podjednako učinkovito smanjuju broj relapsa (za oko 30%) (72). Rano započeto dugoročno liječenje tim lijekovima poboljšava ishod bolesti, poglavito bez značajnih nuspojava (73,74). Natalizumab smanjuje broj relapsa učinkovitije nego navedeni lijekovi prvog izbora, ali zbog neželjenih nuspojava predstavlja drugu liniju liječenja u bolesnika koji ne reagiraju odgovarajuće na druge lijekove ili u bolesnika s težim oblicima bolesti (62,72). Mitoksantron, čija je primjena ograničena zbog teških neželjenih učinaka, predstavlja treću liniju liječenja u bolesnika u kojih prve dvije linije liječenja ne pokazuju odgovarajući učinak (62). Liječenje klinički izoliranog sindroma interferonom smanjuje vjerojatnost progresije bolesti u kliničku MS (5,75). Učinak ostalih navedenih lijekova (fingolimod, teriflunomid i dimetil-fumarat) još se potvrđuje u kliničkim studijama (76).

PP-MS: Nijedna dosadašnja terapija nema zadovoljavajuću učinkovitost u promijeni tijeka PP-MS (62). Od 2011. godine samo je mitoksantron odobren za primjenu kod SP-MS jer usporava progresiju bolesti i smanjuje broj relapsa unutar dvije godine (77,78).

Svi navedeni bolest-modificirajući lijekovi imaju neželjene učinke. Jedan od najčešćih pri primjeni glatiramer-acetata i interferona jest iritacija na mjestu aplikacije, gdje se s vremenom javlja lokalizirana destrukcija masnog tkiva, odnosno lipoatrofija. Interferoni mogu izazvati simptome nalik gripi, a pojedini bolesnici koji uzimaju glatiramer-acetat opisuju crvenilo lica, stezanje u grudima, palpitacije, dispneju i anksioznost u trajanju od manje od 30 minuta. Mnogo teže nuspojave davanja tih lijekova su oštećenje jetre izazvano interferonom, sistolička disfunkcija, smanjena fertilnost i akutna mijeloična leukemija izazvani glatiramer-acetatom te progresivna multifokalna encefalopatija izazvana natalizumabom (79).

### **1.3. Funkcionalna povezanost imunološkog i koštanog sustava – osteoimunologija**

U brojnim autoimunim bolestima, primjerice RA, ankilozirajućem spondilitisu i sistemskom eritematoznom lupusu, poremećen je koštani metabolizam. Uzrok smanjenja koštane mase zbog pojačane lokalne i sustavne koštane razgradnje posredovane osteoklastima je primarno imunološki. U tih bolesti nalazimo poremećen imunološki odgovor limfocita T i B uz često prisutna autoantitijela (reumatoidni faktor, anticitrulinska protutijela). Također postoji značajna povezanost između pojedinih alelnih oblika molekula HLA i razvoja tih bolesti, primjerice HLA-DR4 i RA (80). Na taj poremećaj koštanog metabolizma posredovan imunološkim sustavom nadovezuje se nepovoljan učinak nekih oblika liječenja, posebice primjene kortikosteroida. Obzirom da je i MS autoimuna bolest uzrokovana poremećenim imunološkim odgovorom, neke studije istraživale su profil osteoklastogenetskih molekula u bolesnika koji boluju od MS (81-83), no uzroci poremećenog koštanog metabolizma u tih bolesnika još nisu potpuno razjašnjeni.

#### **1.3.1. Diferencijacija osteoklasta i koštani metabolizam**

Funkcije koštanog sustava uključuju: zaštitu vitalnih organa i koštane srži, potpornu ulogu mišićima, metaboličku ulogu, posebice homeostaze kalcija te sudjelovanje u diferencijaciji hematopoetskih/imunoloških stanica. Kost se neprestano obnavlja u procesu *koštane pregradnje*, tijekom kojeg osteoklasti, izlučivanjem klorovodične kiseline te acidorezistentnih endosomalnih i lizosomalnih enzima, razgrađuju površinski sloj spongiozne ili kortikalne kosti, nakon čega se na tome mjestu, djelovanjem osteoblasta, stvara nova kost. Koštana pregradnja neprestano se fiziološki odvija i u odraslih osoba te osigurava ravnotežu između razgradnje postojećeg i izgradnje novog koštanog tkiva tako da ukupna masa kosti ostaje očuvana. U brojnim stanjima kost se pojačano razgrađuje, primjerice

postmenopauzalnoj osteoporozi, periodontalnoj bolesti, metastatskim tumorima, multiplom mijelomu i različitim oblicima artritisa. Te su bolesti praćene promjenama lokalne ili sistemske razine hormona (primjerice estradiola, dihidrotestosterona, PTH, kalcitonina i 25-hidroksikolekalciferola) i proupalnih citokina (primjerice TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-23), koji remete proces koštane razgradnje ili stvaranja nove kosti. U toj regulaciji ključni su signali koji uključuju receptor RANK (prema engl. *receptor-activator of NF $\kappa$ B*), ligand RANKL i osteoprotegerin (OPG). Uz to, otkriveno je da osteoklasti, osim razgranje kosti, imaju važnu ulogu u regulaciji funkcija osteoblasta i imunoloških stanica u patološkim stanjima (84).

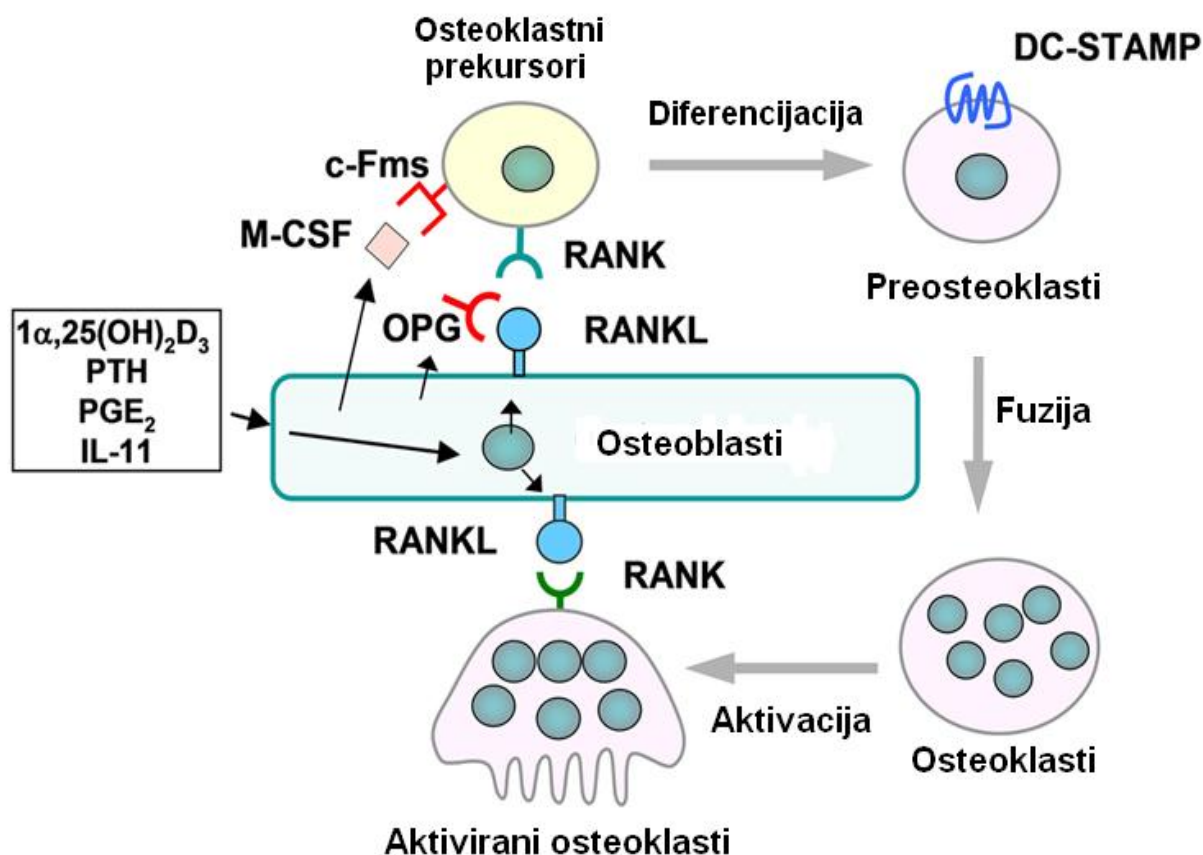
### **1.3.2. Osovina RANKL/RANK/OPG**

Otkriće sustava RANKL/RANK/OPG značajno je doprinijelo razumijevanju funkcije osteoblasta i stromalnih stanica u regulaciji koštanog metabolizma. Osim toga limfociti T izražavaju brojne citokine, uključujući RANKL, koji djeluju na diferencijaciju i aktivnost osteoklasta. Međudjelovanje čimbenika RANKL i IFN- $\gamma$  ključno je u regulaciji stvaranja osteoklasta u upalno promijenjenim zglobovima. Osteoblasti i osteoprogenitorske stromalne stanice luče OPG koji koči aktivnost osteoklasta, te time štiti koštano tkivo od pojačane razgranje, vežući se za čimbenik RANKL i sprečavajući njegovo vezanje za RANK (Slika 4). Odnos čimbenika RANKL/OPG je stoga važan pokazatelj koštane razgradnje u patološkim stanjima (85).

#### **1.3.2.1. RANKL**

Čimbenik RANKL izražen je u membranskom (homotrimerni transmembranski protein tipa II) i topljivom obliku. Nalazimo ga u koštanom tkivu te u limfnim čvorovima, timusu, plućima, slezeni i koštanoj srži. Većina čimbenika koji djeluju osteoresorptivno potiče izražaj čimbenika RANKL na osteoblastima, kondroblastima i stromalnim stanicama.





**Slika 4. Osteoblastna regulacija diferencijacije i funkcije osteoklasta.** Čimbenici koji stimuliraju resorpciju kosti kao što su  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , PTH,  $\text{PGE}_2$  i IL-11 djeluju na osteoblaste na način da potiču izražaj RANKL. Osteoblasti proizvode M-CSF. Osteoklastni prekursori monocitno-makrofagne loze izražavaju RANK i c-Fms. Osteoklastni prekursori stanično-staničnom interakcijom prepoznaju RANKL izražen na osteoblastima i u prisustvu M-CSF se diferenciraju u mononuklearne preosteoklaste. Mononuklearni preosteoklasti izražavaju DC-STAMP koji je od esencijalne važnosti za fuzioniranje preosteoklasta u multinuklearne osteoklaste. Zreli osteoklasti također, izražavaju RANK, a RANKL potiče resorpcijsku aktivnost osteoklasta vežući se za RANK. PTH, paratireoidni hormon;  $\text{PGE}_2$ , prostaglandin  $\text{E}_2$  (prema engl. *prostaglandine E<sub>2</sub>*); RANK, prema engl. *receptor-activator of nuclear-factor  $\kappa\text{B}$* ; RANKL, RANK ligand; M-CSF, čimbenik stimulacije kolonija makrofaga (prema engl. *macrophage colony-stimulating factor*); DC-STAMP, transmembranski protein specifičan za dendritičke stanice (prema engl. *dendritic cell-specific transmembrane protein*). Modificirano prema: Takahashi N, Maeda K, Ishihara A, i sur. Regulatory mechanism of osteoclastogenesis by RANKL and Wnt signals. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011 Jan 1;16:21-30.

Luče ga i aktivirani limfociti T, primjerice u sinovijalnoj tekućini bolesnika koji boluju od reumatoidnog artritisa, gdje potiče razaranje zgloba (86). U isto vrijeme, aktivirani limfociti T pojačano luče IFN- $\gamma$  koji uzrokuje degradaciju adaptorskog proteina receptora RANK (TRAF6, prema engl. *tumour necrosis factor receptor-associated factor 6*), što rezultira inhibicijom aktivacije osteoklasta potaknute čimbenikom RANKL (87).

Takoder, RANKL potiče otpuštanje nezrelih osteoklastnih progenitora u cirkulaciju, kao dio homeostaze hematopetskog sustava, povezujući regulaciju koštane pregradnje s regulacijom hematopoeze (88).

Osim toga pokazano je da signal RANKL/RANK regulira razvoj limfnih čvorova i hiperplaziju mliječnih žlijezda u miša. RANKL je izražen na epitelnim stanicama dojke za vrijeme laktacije te u nekih maligno transformiranih stanica, što govori u prilog moguće uloge čimbenika RANKL u regulaciji stanične proliferacije (89).

### **1.3.2.2. RANK**

RANK, homotrimerni transmembranski protein tipa I, izražen je na brojnim tjelesnim stanicama pa se tako nalazi na ostoklastnim progenitornim stanicama, dendritičkim stanicama kože, u neuronima termoregulacijskih regija mozga, skeletnom mišiću, timusu, jetri, gušterači, debelom crijevu, nadbubrežnoj žlijezdi, prostati, endotelnim stanicama krvnih žila, epitelnim stanicama dojke te u nekim karcinomskim stanicama, uključujući stanice karcinoma dojke i prostate koje često metastaziraju u kost (90,91). Mutacije gena za RANK, koje aktiviraju gen, fenotipski se očituju pojačanom diferencijacijom i aktivacijom osteoklasta, što je najrazvidnije u Pagetovoj bolesti praćenoj osteolizom. S obzirom na njegov pojačan izražaj u tumorskim stanicama, RANK se posljednjih godina aktivno istražuje kao potencijalni cilj antitumorske terapije (89,92).

### **1.3.2.3. Osteoprotegerin**

OPG je, osim u koštanom, izražen u različitim tkivima, uključujući slezenu, koštanu srž, srce, jetru i bubrež. Hormoni, citokini i čimbenici koji potiču izražaj čimbenika RANKL uglavnom smanjuju izražaj čimbenika OPG, što potiče diferencijaciju i aktivnost osteoklasta. Stoga odnos RANKL/OPG korelira s intenzitetom osteoresorpcije u brojnim patološkim stanjima praćenim poremećenom koštanom pregradnjom (93). Na izražaj čimbenika OPG u osteoblastima djeluje signalni put Wnt/ $\beta$ -katenin koji regulira diferencijaciju i aktivnost osteoblasta (94). Stoga se smatra da su za homesotazu koštane mase ključni signalni putevi RANKL/RANK u osteoklastima i Wnt/ $\beta$ -katenin u osteoblastima.

Uz osteoprotektivnu ulogu, u miševa je pokazano da OPG djeluje zaštitno na aterosklerotske kalcifikacije velikih krvnih žila (95). No, u bolesnika s kroničnim bubrežnim zatajenjem, koji razvijaju sekundarni hiperparatireoidizam, osteoporozi i vaskularne kalcifikacije, taj učinak nije dokazan. Zbog navedenog su potrebne daljnje studije koje će dokazati ili odbaciti sada upitnu ulogu RANKL/OPG odnosa u serumu kao indikatora koštane mase odnosno koštane resorpcije (96).

Opisane su dvije bolesti uzrokovane mutacijom gena za OPG. Jedna je Pagetova bolest, praćena pojačanom koštanom pregradnjom, osteopenijom i frakturama, a druga je idiopatska hiperfosfatazija, znakovita po kifozi, deformitetima dugih kostiju i acetabularnoj protruziji, također uzrokovanim pojačanom koštanom pregradnjom (97,98).

### **1.3.3. Regulacija stvaranja i aktivacije osteoklasta**

Regulacija koštane razgradnje podrazumijeva regulaciju diferencijacije osteoklasta iz monocitno/makrofagnih progenitorskih stanica te regulaciju aktivnosti specifičnih funkcionalnih proteina koji u zrelih osteoklasta omogućuju njihovu migraciju, prijanjanje i resorpciju.

U različitim bolestima, primjerice RA, koštanim metastazama i Pagetovoj bolesti, resorpcija kosti osteoklastima nadvlada stvaranje kosti osteoblastima, što dovodi do smanjene koštane mase, fragilnosti kosti i patoloških koštanih fraktura.

#### **1.3.3.1. Morfologija osteoklasta**

Osteoklasti su multinuklearne stanice koje se diferenciraju iz mijeloidnih hematopoetskih stanica, kao i makrofagi i dendritičke stanice. Aktivni osteoklasti su velike multinuklearne stanice s nekoliko desetaka jezgara (promjera do 100  $\mu\text{m}$ ), posebice učinkovite u ionskom transportu, vezikularnom transportu i sekreciji proteina na lokaliziranom mjestu koštane površine. U kosti, zreli osteoklasti se nalaze u resorptivnim jamicama na koštanoj površini nazvanim *Howshipove lakune*. Na histološkim preparatima osteoklasti se doimaju *pjenasti* zbog brojnih vezikula i vakuola s nagomilanim staničnim materijalom. Vakuolarni lizosomi bogati su kiselim fosfatazama pa stoga osteoklaste identificiramo bojenjem na izražaj kisele fosfataze otporne na tartarat (TRAP, prema engl. *tartrate-resistant acid phosphatase*) i katepsin K. Za razliku od razvijenog Golgijevog kompleksa, endoplazmatski retikulum je prilično oskudan u osteoklastima (85,99). Na mjestu aktivne resorpcije kosti, osteoklasti oblikuju specijaliziranu *naboranu* membranu koja je u kontaktu s koštanim tkivom i olakšava razlaganje kosti značajno povećavajući staničnu površinu. To omogućuje učinkovitiju sekreciju i ponovni unos sadržaja koji se resorbira, a morfološka je karakteristika aktivnih osteoklasta.

### 1.3.3.2. Fiziologija osteoklasta

Zreli osteoklast mora biti osposobljen za masivan transport protona koji zakiseljavaju resorpcijsku pukotinu i razlažu mineralizirani matriks. To uključuje pojačanu propusnost naborane membrane za kloride. Usporedo se na *bazolateralnoj* membrani izmjenjuju kloridi i hidrogenkarbonati da se održe fiziološke vrijednosti membranskog potencijala i citosolnog pH (100). Za optimalno zakiseljavanje resorpcijske lakune uz navedeni mehanizam potrebno je osigurati brtvljenje resorpcijskog odjeljka oblikovanjem *zone (pojasa) zatvaranja* putem integrina izraženih na površini osteoklasta (101). Taj mehanizam omogućuje vezikularnu transcitozu degradiranog kolagena s *naborane* prema *bazolateralnoj* membrani i otpuštanje u izvanstanični odjeljak, čime se dovršava koštana resorpcija te se fragmenti kolagena otpuštaju u cirkulaciju.

### 1.3.3.3. Djelovanje osteoklasta

Nakon diferencijacije i aktivacije, osteoklasti se kemotaksijom približavaju mjestima djelovanja, stvaraju *Howshipove lakune* i razgrađuju koštani materijal. Pojas zatvaranja je okružen prstenom specijaliziranih adhezijskih struktura, podosoma. Prianjanje osteoklasta za koštani matriks, posredovano vezanjem integrina  $\alpha V\beta 3$  za matriksni protein osteopontin, potiče koštanu razgradnju. Generiranje velike količine vodikovih iona omogućuje karboanhidraza na *naboranoj* membrani, što dovodi do zakiseljavanja i razgradnje mineraliziranog koštanog matriksa u kalcijske i fosfatne ione, vodu te druge sastojke. Ioni vodika prenosi se u resorpcijsku lakunu protiv velikog koncentracijskog gradijenta protonskim pumpama, posebice vakuolarnom ATP-azom. Uz to, nekoliko hidrolitičkih enzima, uključujući katepsine i MMP, luče se u resorpcijsku lakunu iz lizosoma i razgrađuju organske sastojke matriksa (101,102).

Katepsin K je kolagenolitička cisteinska proteaza nalik papainu, izrazito izražena u osteoklastima. Luči se u resorpcijsku lakunu, a optimalno je aktivna u kiseloj sredini. Glavna je proteaza koja razgrađuje kolagen tipa I i ostale nekolagenske proteine (103).

Skupina MMP uključuje više od 20 endopeptidaza ovisnih o cinku. Osteoklasti izražavaju nekoliko oblika enzima, od kojih su najvažniji MMP-9 i MMP-13 (104).

#### **1.3.4. Slijed diferencijacije osteoklasta**

Osteoklasti se razvijaju iz hematopoetske matične stanice kroz nekoliko stadija diferencijacije. Za diferencijaciju prema osteoklastnoj progenitorskoj stanici ključno je djelovanje makrofagnog čimbenika poticanja kolonija (M-CSF, prema engl. *macrophage colony-stimulating factor*) i transkripcijskog čimbenika PU.1. Nedostatak gena za cFms (receptor za M-CSF) i PU.1 uzrokuje nedostatak makrofaga i osteoklasta. M-CSF potiče proliferaciju osteoklastnih progenitora, podržava njihovo preživljenje i pojačava izražaj receptora RANK, nužnog za osteoklastogenezu. Transkripcijski čimbenik PU.1 veže se za promotorsku regiju gena za cFms te potiče njegovu transkripciju, a miševi kojima nedostaje čimbenik PU.1 razvijaju osteopetrozu. U daljnjem slijedu diferencijacije osteoklasta nužan je transkripcijski čimbenik MITF (prema engl. *microphthalmia-associated transcription factor*) aktiviran signalom čimbenika M-CSF, koji se veže za promotorsku regiju gena koji kodira anti-apoptotski protein Bcl-2 pa miševi kojima nedostaje gen za Bcl-2 razvijaju osteopetrotični fenotip (105-107).

Diferencijaciju osteoklastnih progenitorskih stanica u multinuklearni osteoklast posreduje nekoliko molekula, uključujući par ligand i receptor RANKL/RANK te unutarstanične signalne molekule TRAF6, c-Fos, NF- $\kappa$ B i NFATc1 (prema engl. *nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1*). Uz to važan je i kostimulacijski signal posredovan molekulama Fc $\gamma$  (prema engl. *fragment, crystallisable, receptor  $\gamma$* ) i DAP12 (prema engl.

*DNAX activation protein of 12 kD*). Nedostatak tih molekula uzrokuje osteopetrozu zbog nemogućnosti razvoja multinuklearnih osteoklasta usprkos normalnom ili čak povećanom broju monocitno/makrofagnih stanica. U razvoju multinuklearnih osteoklasta iz mononuklearnih progenitora sudjeluju i molekule DC-STAMP (prema engl. *dendritic cell-specific transmembrane protein*), Gab2 (prema engl. *GRB2-associated-binding protein 2*) i IKK $\beta$  (prema engl. *inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase subunit  $\beta$* ) ali je osteopetroza kod njihova nedostatka manje izražena (108, 109).

Posljednji korak u procesu diferencijacija u zreli funkcionalni osteoklast sa sposobnošću razgradnje kosti i ranije opisanim morfološkim značajkama uključuje molekule c-Src (prema engl. *C-terminal Src kinase*), CIC-7 (prema engl. *circulating immune complexes 7*), Atp6i (prema engl. *H<sup>+</sup> transporting vacuolar proton pump member 1*), katepsin K i LTBP3 (prema engl. *latent transforming growth factor  $\beta$  binding protein 3*). Miševi kojima nedostaju te molekule stvaraju osteoklaste koji nisu funkcionalni u smislu koštane razgradnje (108).

#### **1.3.4.1. Signalni putevi receptora RANK**

Uz M-CSF koji je važan za proliferaciju i preživljenje osteoklastnih progenitora, čimbenik koji izravno regulira osteoklastogenezu je RANKL pa proces diferencijacije osteoklasta možemo analizirati u kontekstu signalizacije RANKL/RANK (Slika 5).

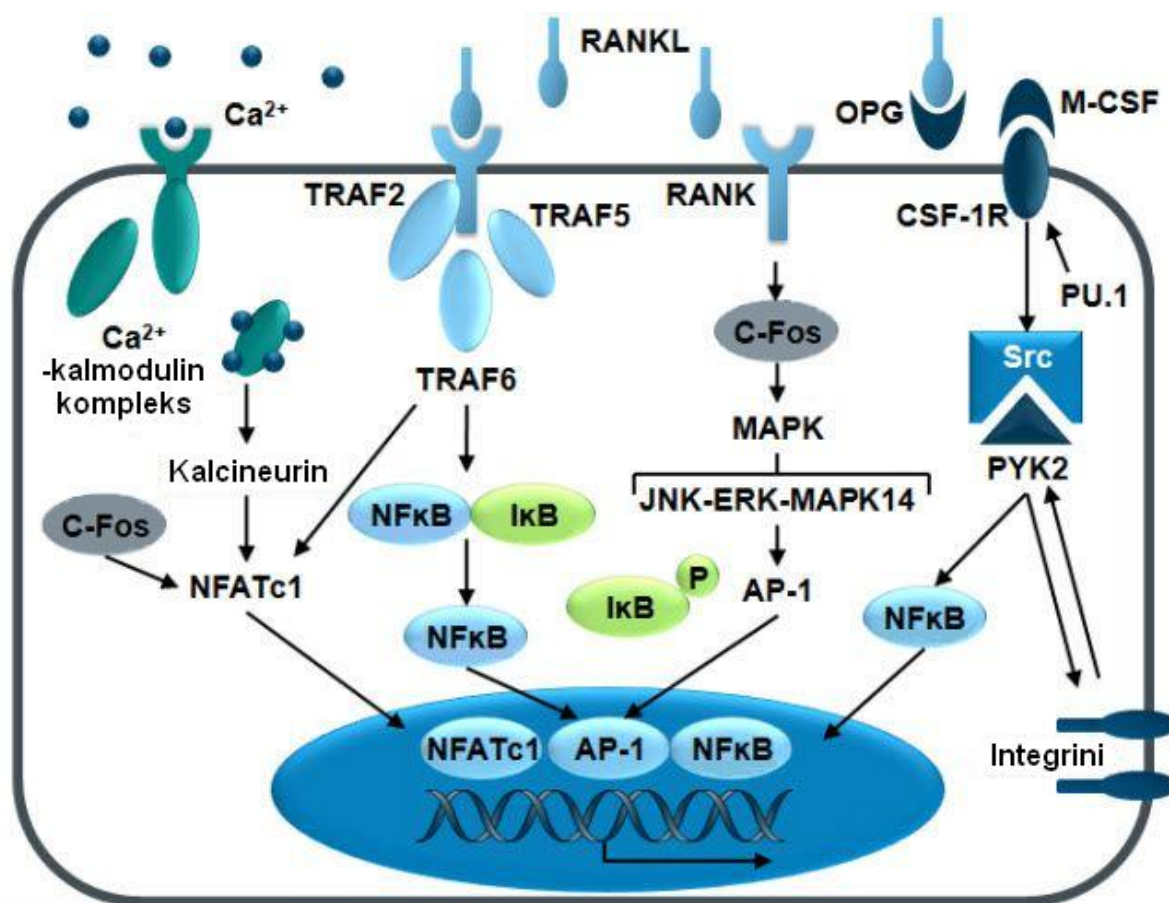
Receptor RANK ne sadrži intrinzičku enzimatsku aktivnost u svojoj intracelularnoj domeni pa za pokretanje unutarstaničnog signala treba adaptorske molekule iz obitelji proteina TRAF, posebice TRAF6. Načelno, ti proteini posreduju signale potaknute citokinima iz obitelji TNF i receptorima PRR (prema engl. *pattern recognition receptor*). Citoplazmatski dio receptora RANK sadrži tri mjesta za vezanje molekule TRAF6 i dva mjesta za vezanje drugih molekula TRAF. Vezanje molekule TRAF6 za RANK potiče trimerizaciju TRAF6 koja posljedično aktivira transkripcijske čimbenike NF- $\kappa$ B i MAPK te kinaze JNK (prema

engl. *c-Jun N-terminal kinase*) i p38. Aktivacija transkripcijskih čimbenika ostvaruje se oblikovanjem signalnog kompleksa RANK/TRAF6/TAB2 (TAB2, prema engl *TGF- $\beta$  activated protein kinase 1-binding protein 2*) koji aktivira NF- $\kappa$ B i MAPK (109-113).

Aktivacija čimbenika NF- $\kappa$ B ključna je za signal receptora RANK te je receptor po tome dobio i ime (114). Obitelj NF- $\kappa$ B je skupina dimernih transkripcijskih čimbenika koji prepoznaju zajedničku DNA-sekvencu nazvanu  $\kappa$ B. U sisavaca postoji pet proteina NF- $\kappa$ B (Rel (cRel), RelA (p65), RelB, NF- $\kappa$ B1 (p50) i NF- $\kappa$ B2 (p52)), a za osteoklastogenezu su ključni p50 i p52, obzirom da miševi s nedostatkom tih molekula razvijaju osteopetrozu zbog poremećaja stvaranja osteoklasta. Proteini NF- $\kappa$ B se u mirujućih (neaktiviranih) stanica nalaze u citoplazmi, a nakon stimulacije različitim agonistima, uključujući i RANKL, brzo ulaze u jezgru. Aktivacija čimbenika NF- $\kappa$ B postiže se dvama signalnim putevima. Klasični signalni put uključuje fosforilaciju inhibicijske  $\kappa$ B kinaze IKK (prema engl. *I- $\kappa$ B kinase*), što uzrokuje njezinu degradaciju. I- $\kappa$ B proteine sadržava većina NF- $\kappa$ B dimera osim p52:RelB koji se nalaze u citoplazmi. Alternativnim putem aktivira se dimer p52:RelB, koji nije vezan za kinazu IKK, a uključuje procesiranje citoplazmatskog kompleksa p100:RelB. Danas se drži da je klasični put aktivacije nužan za osteoklastogenezu (108,115).

Receptor RANK aktivira i kompleks transkripcijskih čimbenika AP-1 (prema engl. *activator protein 1*), posebice ključne komponente c-Fos. Čimbenik AP-1 je dimerni kompleks koji se sastoji od proteina Fos, Jun i ATF (prema engl. *activating transcription factor*). Pri tome je protein c-Fos nužan za aktivaciju čimbenika NFATc1 i razvoj osteoklasta pa miševi kojima nedostaje funkcija proteina c-Fos razvijaju osteopetrozu. Proteini obitelji Jun nisu esencijalni za osteoklastogenezu jer je u mišjem modelu dokazano da se nedostatak pojedinog proteina može nadomjestiti funkcijom drugog. Kinaza MAPK posreduje aktivaciju čimbenika AP-1 pa je stoga važna za sazrijevanje osteoklasta, što je posebice dokazano studijama in vitro (108,116).





**Slika 5. Signalni put receptora RANK.** AP-1, protein-aktivator 1 (prema engl. *activator protein 1*); ERK, kinaze regulirane izvanstaničnim signalom (prema engl. *extracellular signal-regulated kinases*); IκB, inhibitor κB (prema engl. *inhibitor of κB*); M-CSF, čimbenik stimulacije kolonija makrofaga (prema engl. *macrophage colony-stimulating factor*); MAPK, mitogenom aktivirane protein kinaze (prema engl. *mitogen-activated protein kinases*); NFATc1, jezgreni čimbenik aktiviranih stanica T, citoplazmatski 1 (prema engl. *nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic 1*); NFκB, jezgreni čimbenik κB (prema engl. *nuclear factor κB*); OPG, osteoprotegerin (prema engl. *osteoprotegerin*); PYK2, proteinska tirozin kinaza 2 (prema engl. *protein tyrosine kinase 2*); TRAF, čimbenik vezan uz TNF receptor (prema engl. *TNF receptor-associated factor*). Modificirano prema: Edwards JR, Mundy GR. Advances in osteoclast biology: old findings and new insights from mouse models. *Nat Rev Rheumatol.* 2011 Apr;7(4):235-43.

### 1.3.4.2. Uloga čimbenika NFATc1

Signalizacija RANKL/RANK aktivira čimbenike NF- $\kappa$ B, AP-1 i MAPK-a, no ti signalni putevi nisu specifični za RANK te se pokreću i pojedinim citokinima, primjerice IL-1, koji ne potiču samo osteoklastogenezu. Daljnja istraživanja pokazala su da je aktivacija čimbenika NFATc1 ključna u signalizaciji RANKL/RANK, što upućuje na njegovu integralnu ulogu u osteoklastogenezi (117, 118).

Obitelj transkripcijskih čimbenika NFAT otkrivena je u limfocitima T, a uključuje pet članova: NFATc1 (NFAT2), NFATc2 (NFAT1), NFATc3 (NFAT4), NFATc4 (NFAT3) i NFAT5. Uz imunološki sustav, ta obitelj transkripcijskih čimbenika uključena je u regulaciju drugih bioloških sustava, primjerice kardiovaskularnog i mišićnog. Njihova aktivacija posredovana je specifičnom fosfatazom, kalcineurinom, putem signala kalcij/kalmodulin pa inhibitori kalcineurina (takrolimus i ciklosporin A) snažno koče osteoklastogenezu (119).

Za osteoklastogenezu ključan je protein NFATc1. Nakon stimulacije čimbenikom RANKL aktivirani NFATc1 veže se za promotorsku regiju samog NFATc1, a taj autoamplifiacijski mehanizam specifičan je za promotor gena za NFATc1 i odvija se tijekom terminalne diferencijacije osteoklasta. Protein NFATc2 nalazi se u citosolu osteoklastnih progenitora i prije stimulacije čimbenikom RANKL. U fiziološkim uvjetima posreduje inicijalnu indukciju promotora gena za NFATc1 zajedno s čimbenikom NF- $\kappa$ B, a tek pojačano izražen značajnije potiče osteoklastogenezu (118,120).

Ciljni geni aktiviranog čimbenika NFATc1, uz spomenuti proces autoamplifikacije, su za TRAP, kalcitoninski receptor, katepsin K, integrine  $\beta$ 3 i OSCAR (prema engl. *osteoclast-associated immunoglobulin-like receptor*). Posljednji je ključan za stanično-staničnu fuziju osteoklastnih progenitora. Transkripcijska aktivacija diferencijacijskih gena potpomognuta je stvaranjem kompleksa između NFATc1 i kofaktora AP-1 (Fos/Jun), PU.1 i MITF pa različiti kompleksi induciraju različite ciljne gene (121).

### 1.3.4.3. Kostimulacijski signali za RANK

Uz esencijalne osteoklastogenetske čimbenike RANKL i M-CSF, još su neke molekule uključene u signalni proces sazrijevanja osteoklasta. Posebice kostimulacijski receptori OSCAR i TREM2 (prema engl. *triggering receptor expressed by myeloid cells 2*) pojačavaju osteoklastogenetski signal putem adaptorskih proteina DAP12 i FcR  $\gamma$  koji sadrže sekvence ITAM (prema engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) te aktivaciju tirozinske kinaze Syk. Receptor OSCAR, koji pripada imunoglobulinskoj superobitelji molekula, izražen je na osteoklastnoj lozi i ključan je za fuziju mononuklearnih osteoklastnih progenitora te međustaničnu interakciju s osteoblastima (122). TREM2 također pripada imunoglobulinskoj superobitelji molekula i izražen je na mijeloidnim stanicama, a klinički, homozigotna mutacija gena za TREM2 uzrokuje demenciju ranoga početka sa frakturama i cistama kostiju ili bez njih, dok rijetka mutacija na genu za TREM2 (*rs75932628-T*) ukazuje na povišen rizik za razvoj Alzheimerove demencije (123). U kontekstu tih receptora, RANK potiče osteoklastogenezu fosforilacijom sekvenci ITAM i pojačanjem izražaja receptora OSCAR (122).

### 1.3.5. Osteoblastna regulacija osteoklastogeneze

Za uravnoteženu koštanu pregradnju potrebno je usklađeno djelovanje osteoklasta i osteoblasta. Stoga postoji međusobna povratna sprega regulacije funkcija tih dvaju vrsta stanica, primjerice osteoblastno lučenje čimbenika OPG u stanjima pojačane koštane razgradnje koči aktivnost osteoklasta.

Osteoblasti su specijalizirane stromalne stanice mezenhimskog podrijetla koje stvaraju i odlažu koštani matriks te omogućuju mineralizaciju koštanog tkiva. Zreli osteoblasti odlažu izvanstanični matriks, primjerice kolagen tipa I i proteoglikane te kristale kalcijevog fosfata, većinom hidroksiapatita (124,125). Zreli osteoblasti izražavaju neke specifične biljege i receptore za čimbenike rasta, uključujući osteokalcin, koštani sijaloprotein, neke integrine i citokine te receptore za paratireoidni hormon (PTH, prema engl. *parathyroid hormone*) i čimbenicima rasta nalik inzulinu I i II (IGF, prema engl. *insulin-like growth factor*). Nakon završenog procesa stvaranja kosti, manji broj osteoblasta se dalje diferencira u osteocyte uklopljene u izvanstanični koštani matriks.

Uz odgovarajuće osteoblastogenetske čimbenike, osteoblasti se razvijaju iz mezenhimskih progenitorskih stanica (126). Ključni čimbenici rasta koji potiču sazrijevanje osteoblasta i posljedično stvaranje kosti su koštani morfogenetski proteini (BMP, prema engl. *bone morphogenic protein*) i TGF- $\beta$ , koji pripadaju TGF-superobitelji molekula i dijele zajednički TGF- $\beta$  signalni put. I drugi regulacijski sustavi su važni za stvaranje kosti, posebice PTH. Navedeni hormon luči se iz paratireoidnih žlijezda ovisno o serumskoj razini kalcija (127). Intermitentna stimulacija tim hormonom povećava aktivnost osteoblasta, premda u visokim koncentracijama PTH pospješuje razgradnju koštanog matriksa, pa kažemo da djeluje bifunkcionalno. Uz PTH i vitamin D<sub>3</sub>, odnosno njegov aktivni metabolit 1,25-dihidroksi vitamin D<sub>3</sub>, pospješuje stvaranje kosti tako da potiče diferencijaciju osteoblasta

putem receptora za vitamin D3, izraženog na osteoblastnim progenitorima (128). U regulaciji stvaranja kosti sudjeluju još neki hormoni, primjerice adrenokortikotropni hormon koji djeluje slično kao PTH te steroidni hormoni, posebice estrogen i glukokortikoidi.

Osteoblasti proizvode nekoliko čimbenika koji reguliraju diferencijaciju i aktivnost osteoklasta. Najvažniji čimbenici su RANKL i M-CSF. M-CSF luče stanice osteoblastne lože i on djeluje parakrino na osteoklastne progenitore koji izražavaju receptor c-Fms te potiče njihovo preživljenje (129). Za osteoklastogenezu je nužan i RANKL izražen na osteoblastima poglavito u membranskom obliku. Osteoblasti luče i OPG koji djeluje kao neutralizacijski receptor za RANKL te na taj način negativno regulira osteoklastogenezu. Primjerice, OPG može snažno inhibirati stvaranje osteoklasta potaknutih vitaminom D3 i PTH (130).

#### **1.3.6. Imunološka regulacija osteoklastogeneze**

Na koštanu pregradnju, uz regulaciju putem hormona i osteoblasta, djeluje i imunološki sustav. Fiziološko značenje te regulacije nije potpuno objašnjeno, ali se pretpostavlja da se tako iz kosti mobiliziraju ioni kalcija i fosfata, koji sudjeluju u regulaciji upalnih procesa i aktivaciji mehanizama upalne kaskade. I u imunološkoj regulaciji osteoklastogeneze ključna je efektorska signalna osovina RANKL/RANK/OPG.

##### **1.3.6.1. Uloga čimbenika RANKL u imunološkom sustavu**

Regulacijska uloga signalnog puta RANKL/RANK i prije njegova istraživanja u okviru koštane biologije otkrivena je tijekom aktivacije limfocita T i preživljenja dendritičkih stanica. Poznato je da RANKL ima važnu ulogu i u razvoju imunološkog sustava (131). Tijekom razvoja timusa signal aktiviran receptorom RANK regulira mikrookoliš timusnog tkiva i posreduje uspostavu centralne tolerancije (izbjegavanje autoimunosti) uklanjanjem autoreaktivnih klonova limfocita T. U fetalnom timusu aktivacija osovine RANKL/RANK u

podvrsti stromalnih stanica, medularnim timusnim epitelnim stanicama, potiče izražaj autoimunog regulatora (AIRE, prema engl. *autoimmune regulator*) te omogućava predočavanje vlastitih tkivno-specifičnih antigena. Limfociti T koji velikim afinitetom prepoznaju vlastite tkivno-specifične antigene odumiru u timusu apoptozom. Premda RANKL nije ključan za diferencijaciju prirođenih regulacijskih limfocita Treg Foxp3<sup>+</sup> u timusu, on djeluje na funkcije perifernih dendritičnih stanica tako da održava dovoljan broj limfocita Tregs nužnih za uspostavu periferne tolerancije i regulaciju intenziteta imunološkog odgovora (131,132). U pokusnim modelima je pokazano da se presađivanjem timusa u kojem nedostaje izražaj receptora RANK u miševima divljeg soja se izaziva autoimuna reakcija posredovana limfocitima T. Nedostatno poticanje transkripcijskog čimbenika AIRE čimbenikom RANKL tijekom fetalnog razvoja može se u kasnijoj dobi dijelom kompenzirati regulacijom izražaja molekule CD40-ligand na podvrsti aktiviranih limfocita T. U miševa kojima je izbačen gen za RANKL ili RANK poremećen je razvoj limfnih čvorova i Payerovih ploča, što potvrđuje da je signal aktiviran receptorom RANK nužan za razvoj perifernih limfnih organa (133-135).

U patološkim stanjima, primjerice autoimunoj upalnoj bolesti crijeva, RANKL potiče dendritičke stanice, što upućuje na njegovu ulogu u autoimunim procesima. S druge strane, keratinociti izražavaju RANKL kao odgovor na ultraljubičasto zračenje kože, što posljedično može aktivirati Langerhansove stanice i biti okidač ekspanzije Tregs u odvodnim limfnim čvorovima. Dakle, djelovanje čimbenika RANKL na predočne stanice može biti dvojako, pro- i protuupalno, ovisno o kontekstu i lokalizaciji (136,137).

#### **1.3.6.2. Regulacija osteoklastogeneze limfocitima T**

U nekim stanjima aktivirani limfociti T izražavaju RANKL te mogu izravno poticati osteoklastogenezu. Posebice su aktivirani pomagački limfociti T CD4<sup>+</sup> odgovorni za pojačanu osteoklastnu resorpciju kosti kod autoimunog artritisa (138). No limfociti T u

zglobovima bolesnika koji boluju od RA u isto vrijeme luče citokine koji koče signal RANKL/RANK. Odgovor Th1 smatra ključnim za razvoj zglobnih oštećenja, a limfociti Th1 luče IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  u visokim koncentracijama (87). Premda TNF- $\alpha$  potiče aktivnost osteoklasta, IFN- $\gamma$  koči osteoklastogenezu blokiranjem signala pokrenutog receptorom RANK putem brze razgradnje molekule TRAF6. Te su stanice učinkovite u staničnoj imunosti i zaštiti od unutarstaničnih infekcija virusima, bakterijama i drugim mikroorganizmima (139). S druge strane, Th2 stanice stvaraju visoke količine IL-4, IL-5, IL-10 i IL-13 koje pojačavaju humoralne imunološke odgovore koji su odgovorni za zaštitu od parazita. Ipak, neki od ključnih citokina proizvedenih od strane ovih stanica, najviše IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 i IL-2, pokazuju inhibicijski učinak na osteoklastogenezu. (87,139). No navedeni rezultati upućuju na zaključak da niti limfociti Th1 niti Th2 ne posređuju izravno oštećenja kosti u RA.

Daljnjim istraživanjima uvrđeno je da Th17 podvrsta limfocita T najpotentnije potiče diferencijaciju i aktivnost osteoklasta.

U upalno promijenjenim zglobovima kod bolesnika koji boluju od RA povećan je izražaj IL-17 (140). IL-17 potiče lokalnu upalu u autoimunim bolestima preko proizvodnje drugih citokina. U sinovijalnoj tekućini bolesnika izolirani su limfociti Th17 koji izražavaju RANKL, a ne proizvode visoke koncentracije IFN- $\gamma$ . Oni potiču lokalnu upalu i stvaranje upalnih citokina, uključujući i TNF- $\alpha$ , te potiču izražaj čimbenika RANKL na sinovijalnim fibroblastima. Premda limfociti Th17 izražavaju više razine čimbenika RANKL od subpopulacija Th1 i Th2, njihov učinak na osteoklastogenezu je poglavito neizravan, putem poticajnog djelovanja IL-17 na izražaj čimbenika RANKL na mezenhimskim stromalnim stanicama (140,141).

Infiltracija limfocita Th17 u upalno promijenjeni zglob povezuje poremećeni odgovor limfocita T i oštećenje kosti u artritisu te naglašava ulogu limfocita Th17 u patogenezi RA. Terapijske intervencije s ciljem farmakološke inhibicije citokina potrebnih za diferencijaciju

limfocita Th17, primjerice IL-6, TGF- $\beta$  i IL-23, imaju veliki klinički potencijal. Rezultati pokazuju povoljan klinički rezultat inhibicijom limfocita Th17 u različitim upalnim bolestima, uključujući psorijazu, RA i ankilozantni spondilitis (142,143).

Limfociti Tregs odlikuju se sposobnošću inhibicije aktivacije drugih subpopulacija limfocita T, posebice autoreaktivnih. Neutralizacija citokina IL-17 ili IL-6 u kulturama limfocita Th17 usmjerava njihovu diferencijaciju prema limfocitima Tregs. Supresija limfocita Tregs *in vivo* uzrokuje egzacerbaciju artritisa, dok u isto vrijeme povećanje broja limfocita Tregs koči upalu i razaranje kosti. Neka istraživanja pokazuju da povećanje broja limfocita Tregs može imati zaštitni osteoprotektivni učinak posredovan izravnim inhibicijskim djelovanjem Tregs na osteoklastogenezu (144-146).

#### **1.4. Primarni poremećaj aktivnosti osteoklasta u multiploj sklerozi**

Svega je nekoliko studija istraživalo poremećaj osovine RANKL/RANK/OPG u MS (81-83). Trenutno se zna da je u serumu povišena razina RANKL i OPG, ali da su klinički parametri koji dokazuju osteoporozi (prvenstveno gustoća kosti mjerena radiološki) i dalje u granicama normale (82). Ove nalaze povezuje zaključak da u MS postoji tendencija pojačane razgradnje kosti, ali je ona kompenzirana povišenim razinama neutralizacijskog receptora OPG koji štiti kost od razgradnje (147). Obzirom da je osovina RANKL/RANK/OPG povezana sa razvojem autoimunosti, moguće je da u MS dolazi do primarnog poremećaja funkcije tih čimbenika što sekundarno remeti koštani metabolizam. Dosadašnja istraživanja provedena su poglavito na bolesnicima u poodmaklim stadijima bolesti, dugotrajno liječenim imunosupresivnim lijekovima te je potrebno istražiti profil tih regulacijskih molekula u bolesnika na kliničkom početku bolesti.



### 1.4.1 Osteoporoza i multipla skleroza

U bolesnika koji boluju od MS invalidnost smanjuje fizičku aktivnost, što povećava rizik razvoja osteoporoze zbog atrofije mišića i smanjene vlačne sile na kost. Posljedično se smanjuje koštana masa i razvija osteoporoza (148). Dolazi do smanjenja kvalitete kosti, uključujući sastav koštanog matriksa i mikroarhitekturu koštanog tkiva, te poremećaja koštane pregradnje. Uz to, bolesnici se za vrijeme relapsa liječe visokim dozama glukokortikoida, čija je primjena najčešći uzrok razvoja sekundarne osteoporoze u razvijenim zemljama. Zbog smanjene koštane gustoće osteoporoza je praćena kompliciranim frakturama kod padova (*patološke frakture*), što posebice ugrožava bolesnike koji boluju od MS obzirom da su u njih poremećaji ravnoteže i koordinacije povezani sa čestim padovima (149).

### 1.4.2 Glukokortikoidi i osteoporoza

Glukokortikoidi koji se primjenjuju u liječenju bolesnika tijekom relapsa bolesti, bez obzira na povoljan antiuplani učinak, pridonose gubitku kosti i razvoju osteoporoze. Suprafiziološke doze glukokortikoida uzrokuju smanjenje mišićne mase, poremećaj djelovanja hormona rasta i IGF-1 (prema engl. *insulin-like growth factor I*) te razvoj sekundarnog hiperparatiroidizma zbog smanjene intestinalne apsorpcije i povećanog bubrežnog izlučivanja kalcija. Izravno na koštane stanice djeluju tako da koče diferencijaciju, preživljenje i funkcije osteoblasta (sinteze matriksnih proteina, čimbenika rasta i citokina) te potiču preživljenje i aktivnosti osteoklasta. U konačnici dolazi do smanjenja koštane mase te bolesnici koji dugotrajno uzimaju glukokortikoide moraju biti redovito praćeni zbog povećanog rizika razvoja osteoporoze (149,150).

Bolesnici sa MS ne dobivaju glukokortikoide kao kontinuiranu terapiju već se za ublažavanje trajanja i intenziteta relapsa koriste visoke doze glukokortikoida (5). Studija Zorzona i suradnika pokazala je da mladi bolesnici koji boluju od MS, koji inače imaju zanemariv stupanj invalidnosti, nakon “pulsne terapije” glukokortikoidima ubrzano gube kost, a nakon određenog vremena se koštana masa nadoknađuje (151). Druga studija koja je istraživala učinak visokih doza metiprednizolona u kratkom intervalu na kost, također u mladih bolesnika koji boluju od MS, pokazala je da takva primjena ne uzrokuje razvoj osteoporoze (152).

Općenito, možemo reći da mehanizam smanjenja koštane gustoće u bolesnika koji boluju od MS nije potpuno razjašnjen te da nema jasnog odgovora dolazi li do gubitka koštane mase primarno, zbog poremećaja imunološkog sustava, ili sekundarno, zbog neaktivnosti povezane s invaliditetom i terapije lijekovima koji uzrokuju osteoporozu.

## 2. HIPOTEZA

Pretpostavljamo da zbog poremećenog imunološkog odgovora u MS, koji uključuje aktivaciju limfocita T i pojačano lučenje proresorptivnih kemokina i citokina, dolazi do primarnog poremećaja osovine RANKL/RANK/OPG u smislu povećanog omjera RANKL/OPG i pojačane osteoklastogeneze s posljedičnim gubitkom kosti. Na taj primarni poremećaj koštanog metabolizma nadovezuju se sekundarni čimbenici (primjena glukokortikoida, smanjena fizička aktivnost i atrofija mišića) koji pridonose osteoporozi.

## 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj ovog istraživanja je analizirati parametre koštane pregradnje i upale u krvi i cerebrospinalnom likvoru u MS na kliničkom početku bolesti u odnosu na profil osteoresorptivne osovine RANKL/RANK/OPG.

Taj glavni cilj studije istražili smo kroz sljedeće specifične ciljeve:

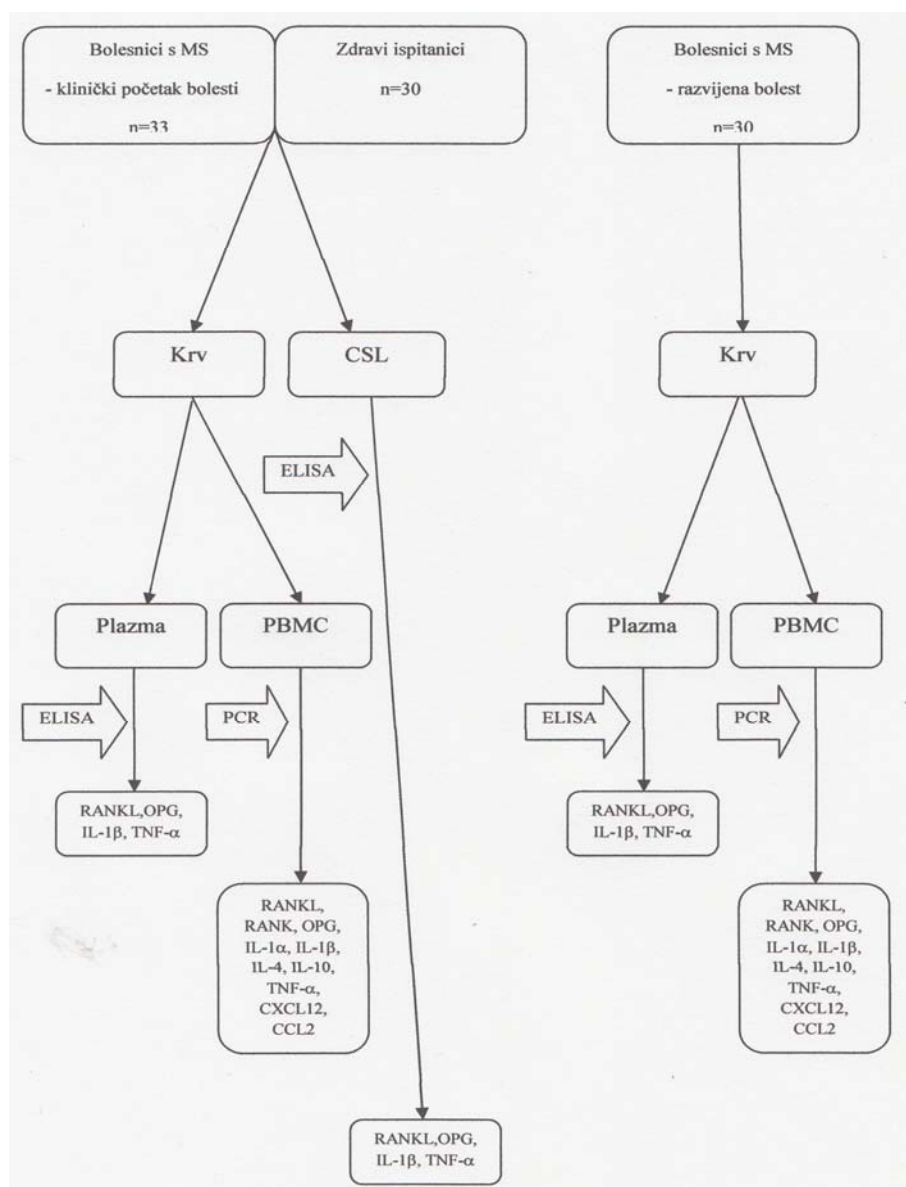
1. Odrediti razine čimbenika diferencijacije osteoklasta (RANK, RANKL i OPG) u krvi i cerebrospinalnom likvoru u bolesnika koji boluju od MS na kliničkom početku bolesti te ih usporediti s vrijednostima u kontrolnih ispitanika i bolesnika s uznapredovalom RR-MS.
2. Odrediti razine proupalnih (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17, TNF- $\alpha$ , CXCL12, CCL2) i imunosupresivnih (IL-4 i IL-10) medijatora u krvi i cerebrospinalnom likvoru bolesnika koji boluju od MS na kliničkom početku bolesti te ih usporediti s vrijednostima u kontrolnih ispitanika i bolesnika s uznapredovalom RR-MS.
3. Korelirati dobivene vrijednosti izražaja osteoklastogenetskih čimbenika, citokina i kemokina u krvi i cerebrospinalnom likvoru s kliničkim parametrima težine bolesti i intenziteta koštane pregradnje.

## 4. MATERIJALI I METODE

Uzorci krvi i cerebrospinalnog likvora prikupljeni su od bolesnika Zavoda za neurologiju i Zavoda za vaskularnu kirurgiju Kliničke bolnice “Dubrava”, a njihova analiza provedena je u Laboratoriju za molekularnu imunologiju Hrvatskog instituta za istraživanje mozga i u Imunološkom laboratoriju Zavoda za fiziologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Istraživanje je ustrojeno kao presječna studija kojom je utvrđen izražaj nekoliko skupina molekula koje djeluju na diferencijaciju i aktivnost imunoloških i osteoklastnih stanica u uzorcima periferne krvi i cerebrospinalnog likvora, posebice molekula osovine RANKL/RANK/OPG, na genskoj i proteinskoj razini.

### 4.1. Ispitanici

Uzorci bolesnika koji boluju od MS prikupljani su na Zavodu za neurologiju Kliničke bolnice “Dubrava” u razdoblju od 2009. do 2014. godine (Slika 6). U istraživanje je uključeno ukupno 66 bolesnika koji boluju od MS, od toga na kliničkom početku bolesti 33 te 30 sa razvijenom RR-MS. U skupini bolesnika koji su na kliničkom početku bolesti bilo je 16 žena i 17 muškaraca, dobi od 20 do 62 godine. U skupini bolesnika sa razvijenom RR-MS bilo je 22 žene i 8 muškaraca, u dobi od 24 do 58 godina. Usporedo su u istom razdoblju prikupljeni kontrolni uzorci na Zavodu za vaskularnu kirurgiju Kliničke bolnice “Dubrava”. Ta skupina uključuje 30 ispitanika, od toga 19 žena i 11 muškaraca, u dobi od 18 do 67 godina. Uz specifične analize u okviru istraživanja, opisane kasnije u odjeljku Metode, na prikupljenim uzorcima provedne su i rutinske kliničke pretrage koje su uključivale: SE (*sedimentacija eritrocita*), CRP (*C-reaktivni protein*), leukocite u krvi, ione Ca, anorganske fosfate, alkalnu fosfatazu te izračunavanje EDSS.



**Slika 6. Dizajn istraživanja.** Istraživanje je provedeno na uzorcima periferne krvi i cerebrospinalnog likvora kontrolnih ispitanika i bolesnika koji boluju od MS. U prikupljenim uzorcima analiziran je proteinski i transkripcijski profil odabranih citokina i kemokina, te su dobiveni rezultati korelirani s kliničkim podacima. MS, multipla skleroza; CSL, cerebrospinalni likvor; ELISA, prema engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*; PCR, lančana reakcija polimeraze (prema eng. *polymerase chain reaction*); PBMC, mononuklearne stanice periferne krvi (prema engl. *peripheral blood mononuclear cells*); RANK, receptor aktivator nuklearnog čimbenika  $\kappa B$  (prema engl. *receptor-activator of nuclear-factor  $\kappa B$* ); RANKL, RANK ligand; OPG, osteoprotegerin (prema engl. *osteoprotegerin*); IL, interleukin; TNF- $\alpha$ , čimbenik nekroze tumora  $\alpha$  (prema engl. *tumor necrosis factor  $\alpha$* ); CXCL, kemokin CXC; CCL, kemokin CC.

#### **4.1.1. Bolesnici na kliničkom početku bolesti**

Jednu skupinu u istraživanju čine bolesnici na kliničkom početku bolesti. U tu skupinu uključeni su bolesnici u trenutku dijagnosticiranja MS, odnosno nakon što je u njih utvrđeno dva ili više relapsa bolesti ili dvije ili više objektivne kliničke lezije prema revidiranim kriterijima po McDonaldu (66). Skupinu čini ukupno 33 bolesnika, a težina bolesti procijenjena prema bodovanju EDSS (63) iznosila je od 0,5 do 4 (medijan 1.5).

U kliničkoj obradi tih bolesnika (diferencijalna krvna slika, biokemijska pretraga urina i sedimentacija urina, leukociti i proteini u cerebrospinalnom likvoru, Pandyjeva reakcija i rentgenogram srca i pluća) isključene su druge upalne demijelinizirajuće bolesti središnjeg živčanog sustava, odnosno druge autoimune ili infektivne bolesti. Također, isključene su sve ostale bolesti koje mogu djelovati na imunološku reaktivnost ili koštani metabolizam, primjerice metaboličke bolesti, bolesti koje izravno ili neizravno remete koncentraciju kalcija i fosfata u krvi te kronične upalne bolesti. Isključeni su i bolesnici u kojih su primijenjivani lijekovi ili medicinski pripravci koje djeluju na aktivnost koštanih stanica i koštanu pregradnju te na aktivnost imunoloških stanica i imunološki odgovor, primjerice kortikosteroidi.

Tijekom uobičajenog dijagnostičkog protokola tim bolesnicima uzimaju se uzorci periferne krvi i cerebrospinalnog likvora. Uz odobrenje Etičkog povjerenstva Kliničke bolnice “Dubrava” i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te vlastoručno potpisani informirani pristanak, dio tih uzorka periferne krvi i cerebrospinalnog likvora upotrijebljen je za dodatne analize u okviru doktorske disertacije.

#### **4.1.2. Bolesnici s uznapredovalom bolešću**

U drugu pokusnu skupinu uključeni su bolesnici koji boluju od MS tijekom 2 do 10 godina (medijan 5) te je u njih dijagnosticiran klinički oblik bolesti RR-MS prema revidiranim kriterijima po McDonaldu (66). Ti bolesnici redovito primaju IFN- $\beta$  (Betaferon; supkutana aplikacija 9,6 UI svaki drugi dan). Uz to, bolesnici se tijekom relapsa liječe intermitentnom pulsnom kortikosteroidnom terapijom (metilprednizolon; intravenska aplikacija 500-1000 mg 3-5 dana uz gastroprotekciju). Tu skupinu kliničkog oblika bolesti RR-MS čini 30 bolesnika, a procjena njihove težine bolesti prema EDSS bodovanju također se kretala u rasponu od 0,5 do 4, slično skupini bolesnika na kliničkom početku bolesti. Kao i u prethodnoj skupini, isključene su sve druge upalne demijelinizirajuće bolesti središnjeg živčanog sustava te bolesti i lijekovi koji mogu djelovati na koštani metabolizam i imunološki sustav, osim opisane primjene IFN- $\beta$  (kontinuirana primjena) i kortikosteroida (tijekom relapsa).

U tih bolesnika dodatno su, uz rutinsku kliničku obradu, u okviru istraživanja analizirani uzorci periferne krvi, nakon dobivanja vlastoručno potpisanog informiranog pristanka. Uzorci cerebrospinalnog likvora nisu uzimani jer u opisanoj fazi bolesti ne predstavljaju dio rutinske kliničke dijagnostike te njihovo prikupljanje nije etički prihvatljivo.

#### **4.1.3. Kontrolni ispitanici**

Kontrolnu skupinu sačinjavalo je 30 ispitanika koji su na Zavodu za vaskularnu kirurgiju Kliničke bolnice "Dubrava" podvrgnuti elektivnom operativnom zahvatu vena donjih ekstremiteta zbog liječenja venskih varikoziteta. Operativni zahvat provodi se u epiduralnoj anesteziji prilikom koje se anestetik daje u epiduralni prostor. Za vrijeme postupka uvođenja u anesteziju, anesteziolog koristi iglu uvodnicu (mandren) kroz koju uvodi cjevčicu (epiduralni kateter) za primijenu anestetika (ksilokain; 250-300 mg, 1% otopine).

Nakon uvođenja mandren se vadi, a iz cjevčice se ispusti nekoliko kapi cerebrospinalnog likvora.

Za potrebe istraživanja prikupila se ta količina cerebrospinalnog likvora, dovoljna za provođenje svih planiranih analiza. Usporedo je u istog bolesnika dodatno analiziran uzorak periferne krvi, uzet radi provođenja rutinske kliničke obrade u okviru planiranog zahvata (liječenja osnovne bolesti). Uzorci su prikupljeni nakon dobivanja vlastoručno potpisanog informiranog pristanka ispitanika.

U kontrolnu skupinu uključeni su samo ispitanici koji su prema dobivenim rezultatima kliničkih pretraga bili zdravi, osim dijagnoze venskih varikoziteta donjih ekstremiteta. Isključeni su svi ispitanici koji su bolovali od upalnih, autoimunih, infektivnih ili metaboličkih bolesti. Također su isključeni ispitanici liječeni lijekovima koji djeluju na imunološku reaktivnost ili koštanu pregradnju.

#### **4.2. Metode**

U skladu s ciljevima istraživanja, iz uzoraka periferne krvi izdvojene su mononuklearne stanice te je u njima analiziran izražaj gena za upalne i koštano-regulacijske molekule (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$ , CXCL12, CCL2, RANK, RANK i OPG) postupkom kvantitativne reakcije lančane polimeraze (qPCR, prema engl. *quantitative polymerase chain reaction*). Usporedno je iz uzoraka periferne krvi izdvojena plazma te je u tim uzorcima određena koncentracija upalnih i koštano-regulacijskih molekula na proteinskoj razini (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , RANKL, OPG) postupkom ELISA (prema engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*). U uzorcima cerebrospinalnog likvora nije bilo dovoljno stanica za izolaciju RNA i analizu izražaja gena te je stoga u tim uzorcima određena samo proteinska razina spomenutih molekula postupkom ELISA.



#### 4.2.1. Uzimanje uzoraka

Uzorci periferne krvi (3-4 mL) dobiveni su standardnom venepunkcijom iz kubitalne vene u epruvete obložene antikoagulansom etilen-diamin-tetraoctenom kiselinom (EDTA, prema engl. *ethylene diamine tetra acetic acid*). Od tog je uzorka, koji je korišten za rutinsku kliničku analizu, izdvojen 1 mL periferne krvi koja je razrijeđena fiziološkom otopinom puferiranom fosfatnim puferom (PBS, prema engl. *phosphate buffered saline*) u omjeru 1:1. Tako razrijeđeni uzorak nadslojen je na otopinu za razdvajanje na gradijentu fikola (Histopaque, Sigma, St. Louis, SAD; gustoća 1.077 g/mL). Nakon vrtnje tijekom 25 min na sobnoj temperaturi brzinom 400 x g, gornji sloj koji sadrži razrijeđenu plazmu prikupljen je za određivanje proteinske razine ciljnih molekula i spremljen na temperaturu od -80°C do provođenja analize. Prsten mononuklearnih stanica periferne krvi (PBMC, prema engl. *peripheral blood mononuclear cells*) izdvojen je i opran dva puta u otopini PBS te homogeniziran i smrznut u otopini za izolaciju RNA (Tri Reagent, Sigma-Aldrich Corp.)

Uzorci cerebrospinalnog likvora (300-400 µL) su prikupljeni tijekom standardne dijagnostičke procedure u bolesnika na kliničkom početku MS te tijekom uvođenja u epiduralnu anesteziju u kontrolnih ispitanika. Uzorci nisu sadržavali dovoljno mononuklearnih stanica za analizu izražaja gena. Nakon prikupljanja su centrifugirani tijekom 5 minuta brzinom vrtnje 400 x g, na temperaturi od 4°C. Supernatant je prenesen u sterilnu epruvetu i smrznut na temperaturu od -80°C do provođenja analize.

#### 4.2.2. Izolacija RNA

Uzroci PBMC (1-2 milijuna stanica) homogenizirani su i smrznuti u otopini za izolaciju RNA Tri Reagent (1 mL). Nakon odmrzavanja uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi tijekom 10 minuta, a potom centrifugirani brzinom od 12.000 x g tijekom 30 minuta na temperaturi +4°C. Potom je u uzorke dodano 0,2 mL kloroforma, uzorci su

inkubirani tijekom 2 minute na temperaturi od 4°C i centrifugirani brzinom 10.000 x g tijekom 15 minuta na temperaturi od 4°C. Gornja, vodena faza, je prenešena u novu epruvetu, na nju je dodano 0,5 mL izopropanolola te je otopina inkubirana tijekom 60 minuta na temperaturi od -20°C da se RNA precipitira. Ponovnim centrifugiranjem pri brzini 12.000 x g tijekom 15 minuta na temperaturi od 4°C istaložen je dobiveni precipitat na dno epruvete, opran etanolom (75%) i centrifugiran brzinom od 7.500 x g tijekom 5 minuta na temperaturi od 4°C.

Dobivani talog RNA otopljen je u destiliranoj vodi (30 µL) te je izmjerena količina i čistoća dobivene RNA pomoću UV-VIS spektrofotometra za mjerenje malih uzoraka (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, SAD). Mjerena je apsorbancija (A) pri 260 nm i 280 nm te je određen njihov omjer koji je za sve uzorke iznosio  $A_{260/280} > 1,8$ , ukazujući na kvalitetnu RNA.

#### **4.2.3. Obrnuto prepisivanje i kvantitativna reakcija lančane polimeraze**

Ukupna stanična RNA je potom obrnuto prepisana i umnožena postupkom qPCR. Izolirana RNA (1 µg po uzorku) prepisana je u komplementarnu DNA (cdDNA, prema engl. *complementary DNA*) postupkom obrnutog prepisivanja (RT, prema engl. *reverse transcription*) upotrebom seta kemikalija High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) prema uputama proizvođača. Ukratko, u svaki uzorak RNA (u ukupnom volumenu 9 µL) dodan je 2X RT pufer (10 µL) i 20X mješavina enzima reverzne transkriptaze (1 µL) i inkubirano na temperaturi od 37°C tijekom 60 minuta. Reakcija je zaustavljena grijanjem tijekom 5 minuta na temperaturi od 95°C.

Dobivena cdDNA analizirana je postupkom qPCR pomoću uređaja ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Analizirani su izražaji gena sustava RANKL/RANK/OPG te upalnih i koštanih-regulacijskih citokina (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10,

IL-17, TNF- $\alpha$ ) i kemokina (CXCL12 i CCL2) pomoću komercijalno dostupnih setova kemikalija TaqMan Assay (Applied Biosystems) i TaqMan Gene Expression Master mix (Applied Biosystems) prema uputama proizvođača. TaqMan Assay sastoji se od para specifičnih začetnika i probe koja na 5'-kraju ima fluorescentnu boju 6-FAM, a na 3'-kraju hvatač fluorescencije (NFQ, prema engl. *nonfluorescent quencher*). Proba se veže na cDNA između oba začetnika, a produljenjem začetnika, DNA polimeraza cijepa probu i tako dovodi do odvajanja fluorescentne boje od NFQ i emitiranja fluorescencije. Svaka reakcija sastojala se od duplikata, u reakcijskom volumenu od 25  $\mu$ L, u pločicama s 96 zdenaca (ABI PRISM Optical 96-Well Plate; Applied Biosystems). Smjesa sadržava: 0,5  $\mu$ L cDNA (25 ng); 0,25 U uracil N-glikozilaze (AmpErase; Applied Biosystems); po 200 nM 5'-začetnika i 3'-začetnika; 250 nM TaqMan probe i 0,625 U DNA-polimeraze (AmpliTaq Gold DNA polymerase). Tijekom umnožavanja uzorci su inkubirani tijekom 2 minute na temperaturi od 50°C kako bi se aktivirao enzim uracil N-glikozilaza, a potom tijekom 10 minuta na temperaturi od 95°C da bi se uracil N-glikozilaza inaktivirala, a aktivirala DNA-polimeraza. Potom slijedi 40 ciklusa tijekom kojih su uzorci inkubirani na 95°C kroz 15 s i na 60°C kroz 60 s. Rezultati su prikazani kao relativna količina cDNA prema relativnoj standardnoj krivulji. Standardna krivulja dobivena je uporabom 5 serijskih razrjeđenja uzorka za kalibraciju (cDNA iz PBMC kontrolnih uzoraka). Relativna količina RNA u uzorcima je izražena u odnosu na količinu RNA za GAPDH (prema engl. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), koji je služio kao „endogena“ kontrola (ubikvitarno izraženi gen u svim stanicama). Relativna količina RNA za ciljani gen u uzorku izražena je u odnosu na količinu RNA za GAPDH i prikazana za pojedine skupine uzoraka.

#### 4.2.4. Postupak ELISA

Količina ciljnih proteina u uzorcima plazme i cerebrospinalne tekućine za proučavanje i koštane-regulacijske molekule određena je postupkom ELISA. Obzirom na male očekivane koncentracije pojedinih molekula korišteni su setovi kemikalija ELISA s velikom osjetljivošću: IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  (Platinum sensitive ELISA, eBioscience, San Diego, CA, USA) te solubilni (s)RANKL i OPG (High Sensitivity ELISA Immunoassays, Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, Beč, Austrija).

Postupak je proveden prema uputama proizvođača. Ukratko, uzorci (volumena 20-50  $\mu$ L) su dodani na pločice obložene specifičnim protutijelima i inkubirani 2 do 16 sati na sobnoj temperaturi (ovisno o pojedinom setu ELISA). Ovisno o uputama, pločice su oprane 4 puta puferom za ispiranje (za setove IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ ) ili su bez ispiranja (za setove sRANKL i OPG) dodana specifična protutijela konjugirana peroksidazom (HRP, prema engl. *horseradish peroxidase*). Nakon inkubacije tijekom 1-4 sata (ovisno o uputama) na sobnoj temperaturi pločice su oprane 4 puta puferom za ispiranje. Reakcija vezanja specifičnog protutijela za ciljni protein vizualizirana je kolorimetrijski, uporabom substrata tetra-metil-benzidin (TMB; prema engl. *tetramethylbenzidine*), te zaustavljena nakon 20-30 minuta hidroklornom kiselinom, ovisno o brzini razvoja reakcije. Optička gustoća (OD, prema engl. *optic density*) je određena unutar 15 minuta od zaustavljanja reakcije na čitaču mikropločica (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), na ekscitacijskoj valnoj dužini 450 nm.

Koncentracije proteina u uzorcima plazme i cerebrospinalnog likvora određene su prema standardnoj krivulji odnosa očitavanja OD i koncentracije standardne otopine. Standardna krivulja dobivena je uporabom 6 serijskih razrjeđenja standardne otopine poznate koncentracije uključene u svaki set kemikalija. Za kontrolu postupka ELISA uz uzorke nepoznate koncentracije i razrjeđenja standardne otopine usporedno su analizirani i kontrolni uzorci (pozitivna i negativna kontrola).

### 4.3. Statistička analiza

Klinički i laboratorijski podaci za svaku skupinu ispitanika prikazani su medijanima uz interkvartilni raspon (IQR, prema engl. *interquartile range*). Također, vrijednosti relativnog izražaja gena u uzorcima PBMC te koncentracije proteina u plazmi i cerebrospinalnom likvoru za proupalne i koštane-regulacijske molekule prikazane su medijanima uz IQR.

Statistička analiza razlike između skupina provedena je uporabom neparametrijskog testa Mann-Whitney za usporedbu dvije skupine ili testa Kruskal-Wallis te *post hoc* testa Mann-Whitney uz korekciju po Bonferroniju za usporedbu tri skupine. Povezanost vrijednosti kliničkih i laboratorijskih podataka te vrijednosti izražaja gena i koncentracije proteina analizirana je postupkom korelacije ranga i Spearmanovog koeficijenta rho ( $\rho$ ) s 95%-tnim intervalom pouzdanosti (CI, prema engl. *confidence interval*). Za testiranje učinkovitosti razlikovanja (diskriminacije) dobivenih vrijednosti između kontrolne skupine i skupine bolesnika koji boluju od MS raobljene su krivulje ROC (prema engl. *receiver-operating characteristic*). Analizom je prikazana površina ispod krivulje (AUC, prema engl. *area under the curve*) s 95%-tnim CI, a dijagnostička efikasnost procijenjena je osjetljivošću i specifičnošću testa kod određene prijelomne vrijednosti.

U svim smo testovima za razinu statističke značajnosti (vrijednost  $\alpha$ ) postavili  $p < 0,05$ . Za statističku obradu podataka korišten je računalni program MedCalc (version 12,5, MedCalc Inc., Mariakerke, Belgija).

## 5. REZULTATI

Rezultati dobiveni laboratorijskim pretragama i specifičnim analizama provedenim u skladu s postavljenim ciljevima doktorske disertacije, na uzorcima bolesnika koji boluju od MS i kontrolnih ispitanika, podijeljeni su u tri skupine. Prva skupina rezultata prikazuje čimbenike osovine RANKL/RANK/OPG u krvi i cerebrospinalnom likvoru kontrolnih ispitanika i bolesnika. Druga skupina rezultata prikazuje proupalne i antiupalne medijatore (citokine i kemokine) u krvi i cerebrospinalnom likvoru, odnosno TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL12, CCL2, IL-17, IL-10 i IL-4 te odnos njihova izražaja s čimbenicima osovine RANKL/RANK/OPG. Treća skupina rezultata dobivena je statističkom analizom korelacija između laboratorijskih i kliničkih parametara u bolesnika koji boluju od MS na kliničkom početku bolesti te odabranih regulacijskih čimbenika koji su pokazatelji aktivnosti osteoklasta i koštane razgradnje.

### 5.1. Značajke bolesnika i kontrolnih ispitanika

Glavni cilj istraživanja bio je utvrditi poremećaj osovine RANKL/RANK/OPG u bolesnika koji boluju od MS na kliničkom početku bolesti u odnosu na odgovarajuće zdrave ispitanike, kao pokazatelja aktivnosti osteoklasta i koštane razgradnje. Skupina bolesnika s uznapređovalom MS (kliničkog oblika RR-MS) dodatno je uključena kako bi se utvrdio učinak tijekom bolesti i primijenjenog liječenja na čimbenike te osovine u odnosu na klinički početak bolesti (Tablica 3).

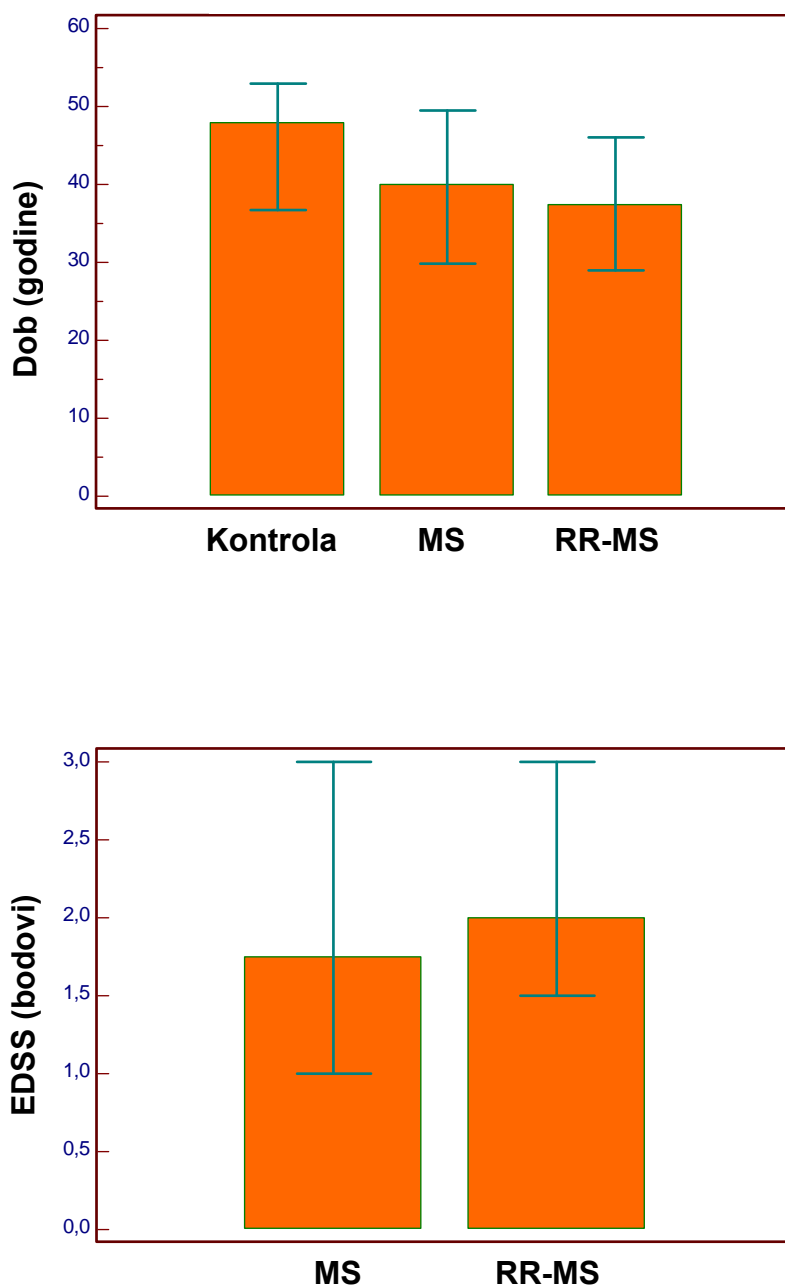
Skupine kontrolnih ispitanika i bolesnika nisu se međusobno razlikovale po dobi i spolu (Tablica 3, Slika 7). Sustavni upalni parametri (broj leukocita, SE, CRP), određeni tijekom standardne kliničke obrade u kontrolnoj skupini i skupini bolesnika na kliničkom

početku bolesti, kretali su se u fiziološkom rasponu ( $5$  do  $10 \times 10^9/L$  za leukocite,  $<5$  mg/L za CRP i  $<15$  mm/h za SE). Ciljne molekule analizirane su na razini izražaja gena u odijeljenim mononuklearnim stanicama periferne krvi postupkom qPCR, a na proteinskoj razini u plazmi i cerebrospinalnom likvosu postupkom ELISA. U bolesnika na kliničkom početku bolesti učinjene su i dodatne laboratorijske analize serumskih razina parametara koštanog metabolizma (alkalna fosfataza, kalcij, fosfati).

**Tablica 3. Značajke kontrolnih ispitanika i bolesnika koji boluju od multiple skleroze**

<b>Značajka</b>	<b>Kontrolni (zdravi) ispitanici (n=30)<sup>a</sup></b>	<b>Bolesnici na kliničkom početku MS (n=33)</b>	<b>Bolesnici koji boluju od RR-MS (n=30)</b>
<b>Dob, godine</b>	42,5 (35,0 – 47,0)	37,0 (28,0 – 49,5)	37,5 (29,5 – 45,5)
<b>Spol, Ž/M</b>	19/11	16/17	22/8
<b>Leukociti, <math>\times 10^9/L</math></b>	7,6 (6 – 9,1)	7,6 (5,6 – 9,0)	NO
<b>CRP, mg/L</b>	0,9 (0,5 – 1,6)	0,8 (0,5 – 1,2)	NO
<b>SE, mm/h</b>	7,0 (6,0 – 10,0)	6,0 (5,0 – 11,5)	NO
<b>EDSS (skala 0 do 10), bodovi</b>	NO	1,8 (1,0 – 3,0)	2,0 (1,5 – 3,0)

<sup>a</sup> Podatci su prikazani kategorički, za spol, ili medijanom (uz interkvartilni raspon) za sve ostale varijable. Ž/M, žene i muškarci; MS, multiple skleroza; RR-MS, relapsno-remitirajući oblik MS; CRP, C-reaktivni protein; SE, sedimentacija eritrocita; EDSS, skala procjene težine bolesti, prema engl. *expanded disability status scale*; NO, nije određivano.



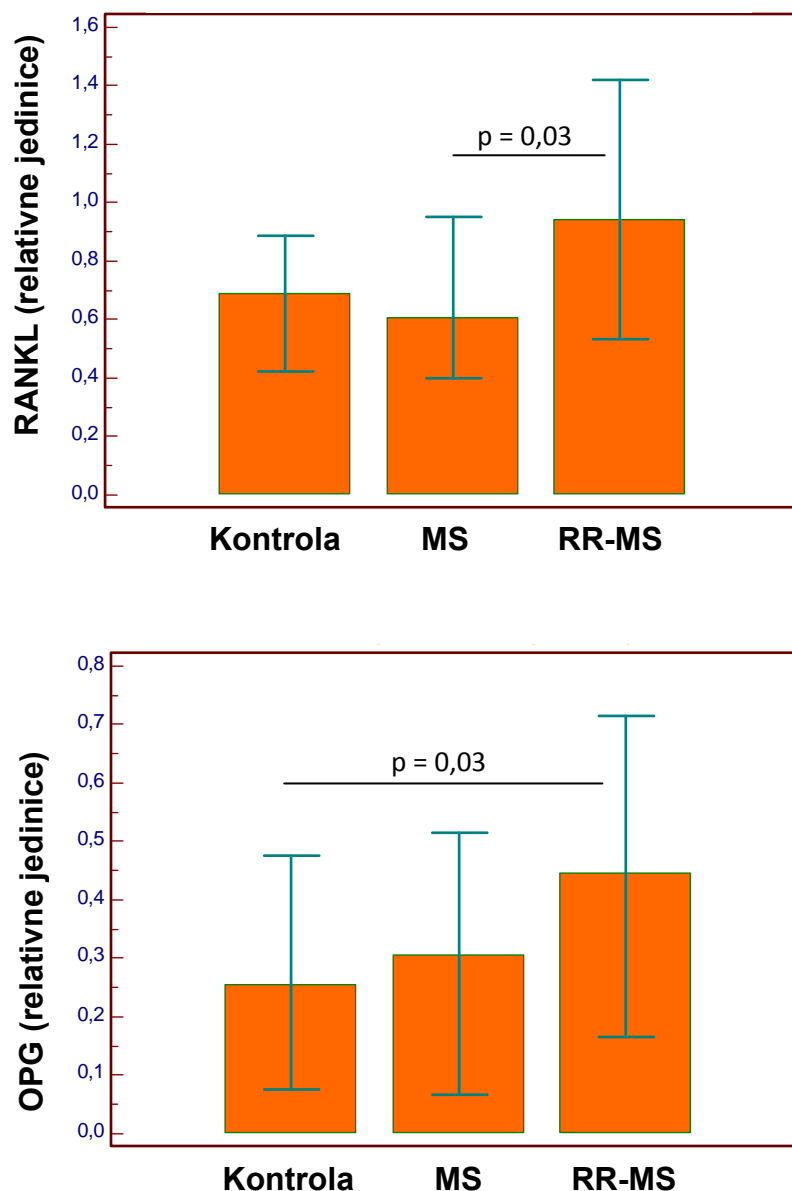
**Slika 7. Značajke skupina kontrolnih ispitanika i bolesnika koji boluju od multiple skleroze.** Studija je uključivala kontrolne ispitanike (n=30) te dvije skupine bolesnika: bolesnike koji boluju od MS na kliničkom početku bolesti (MS, n=33) te bolesnike koji boluju od uznapredovale bolesti relapsno-remitirajućeg kliničkog oblika (RR-MS, n=30). Skupine se nisu međusobno značajno razlikovale po dobi. Klinički je MS procijenjena prema skali procjene težine bolesti EDSS (prema engl. *expanded disability status scale*), a procjena se nije značajno razlikovala između skupina MS i RR-MS. Rezultati su prikazani kao medijan (uz interkvartilni raspon), a razlika između skupina testirana je Kruskal-Wallis testom za dob, te Mann-Whitney testom za EDSS.



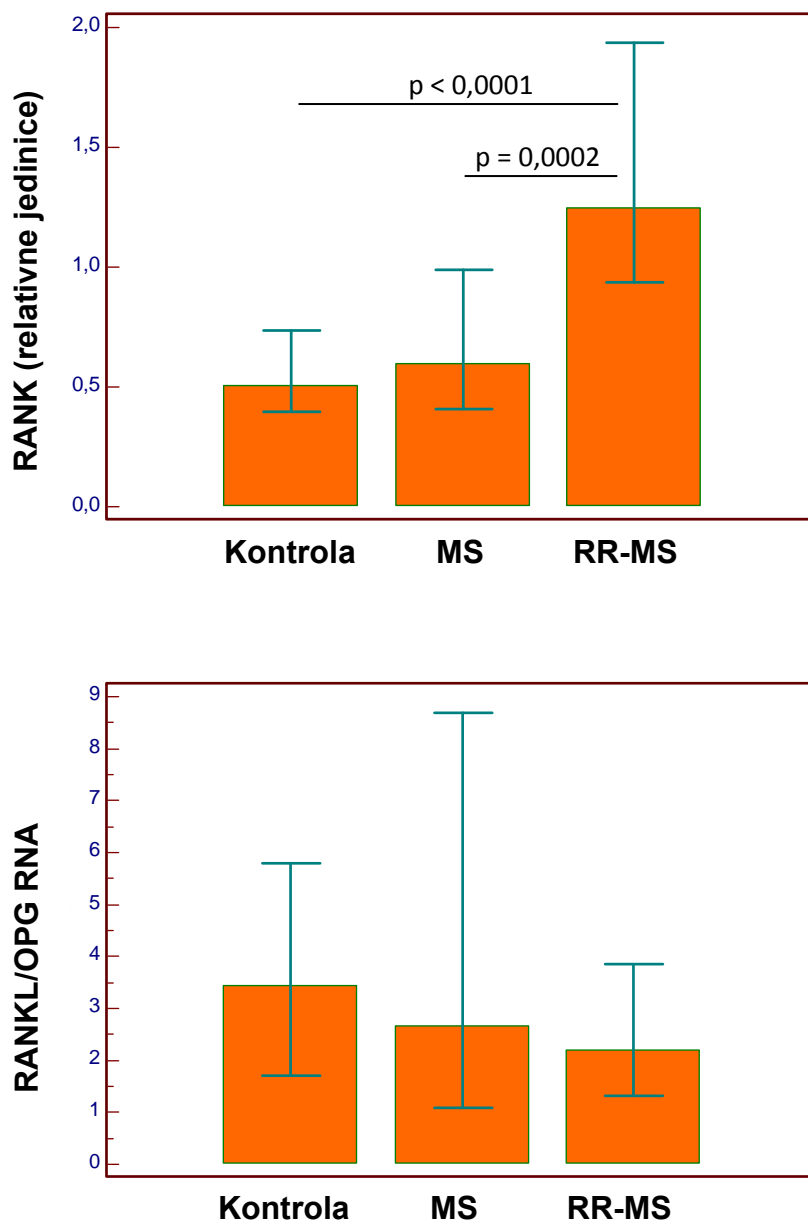
## 5.2. Čimbenici osovine RANKL/RANK/OPG u krvi i cerebrospinalnom likvoru

U svrhu testiranja hipoteze o ulozi osovine RANKL/RANK/OPG u patogenezi MS, postavljene u ovoj doktorskoj disertaciji, u prvom nizu pokusa odredili smo profil izražaja gena za molekule OPG, RANKL i RANK u mononuklearnim stanicama periferne krvi bolesnika na kliničkom početku MS te ga usporedili s profilom izražaja gena u uzorcima kontrolne skupine te u uzrocima bolesnika sa uznapredovanom RR-MS. Čimbenici te osovine važni su u regulaciji imunološkog odgovora, ali su također nužni za aktivaciju osteoklasta. Vezanjem čimbenika RANKL za receptor RANK, izražen na osteoklastnim progenitorima, pokreću se signalni putevi ključni za diferencijaciju osteoklasta u zrele funkcionalne stanice koje razgrađuju kost. Pri tome OPG djeluje kao neutralizacijski receptor za RANKL, čime koči aktivnost osteoklasta i koštanu razgradnju (85).

Rezultati analize izražaja gena postupkom qPCR pokazali su da nema značajne razlike između skupina zdravih ispitanika i bolesnika na kliničkom početku MS (Slika 8). Međutim značajna razlika uočena je između skupina zdravih ispitanika i bolesnika s uznapredovalom RR-MS, i to za RANK ( $p < 0,0001$ ) i OPG ( $p = 0,03$ ), koji su jače izraženi u toj skupini bolesnika. Također, skupina bolesnika s uznapredovanom RR-MS imala je značajno veći izražaj gena za RANK ( $p = 0,0002$ ) i RANKL ( $p = 0,03$ ) u odnosu na skupinu bolesnika na kliničkom početku bolesti (Slika 9). Iz toga možemo zaključiti da izražaj gena za čimbenike RANKL/RANK/OPG u mononuklearnim stanicama periferne krvi nije promijenjen u bolesnika na kliničkom početku MS u odnosu na zdrave ispitanike, ali se značajno povećava u uznapredovaloj RR-MS, i to i u odnosu na zdrave ispitanike i u odnosu na bolesnike na kliničkom početku MS. Međutim, omjer izražaja gena za RANKL i OPG, koji je pokazatelj aktivnosti osteoklasta, bio je usporediv u svim skupinama, jer se i u skupini bolesnika koji boluju od RR-MS izražaj gena za oba čimbenika povećavao razmjerno.



**Slika 8. Izražaj gena za RANKL i OPG u mononuklearnim stanicama periferne krvi kontrolnih ispitanika i bolesnika koji boluju od multiple skleroze.** Analiza je uključivala kontrolne ispitanike te dvije skupine bolesnika: bolesnike koji boluju od MS na kliničkom početku bolesti (MS) te bolesnike koji boluju od uznapredovale bolesti relapsno-remitirajućeg kliničkog oblika (RR-MS). RNA je izolirana iz mononuklearnih stanica periferne krvi, prepisana u cDNA i analizirana postupkom qPCR. Vrijednosti izražaja gena dobivene su uporabom standardne krivulje izražaja ciljnoga gena u uzorku za kalibraciju (cDNA iz kontrolnog uzorka) i normalizirane u odnosu na količinu cDNA za GAPDH („endogena“ kontrola), a prikazane su kao medijan uz interkvartilni raspon za svaku skupinu. Razlika između skupina analizirana je Kruskal-Wallis testom te *post hoc* Mann-Whitney testom uz korekciju po Bonferroniju. Prikazane su samo statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ). RANKL, prema engl. *receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand*; OPG, osteoprotegerin.



**Slika 9. Izražaj gena za RANK i omjer RANKL/OPG u mononuklearnim stanicama periferne krvi kontrolnih ispitanika i bolesnika koji boluju od multiple skleroze.** Analiza je uključivala kontrolne ispitanike te dvije skupine bolesnika: bolesnike koji boluju od MS na kliničkom početku bolesti (MS) te bolesnike koji boluju od uznapredovale bolesti relapsno-remitirajućeg kliničkog oblika (RR-MS). RNA je izolirana iz mononuklearnih stanica periferne krvi, prepisana u cDNA i analizirana postupkom qPCR. Vrijednosti izražaja gena dobivene su uporabom standardne krivulje izražaja ciljnoga gena u uzorku za kalibraciju (cDNA iz kontrolnog uzorka) i normalizirane u odnosu na količinu cDNA za GAPDH („endogena“ kontrola), a prikazane su kao medijan uz interkvartilni raspon za svaku skupinu. Razlika između skupina analizirana je Kruskal-Wallis testom te *post hoc* Mann-Whitney testom uz korekciju po Bonferroniju. Prikazane su samo statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ). RANK, prema engl. *receptor activator of NF- $\kappa$ B*; RANKL; RANK ligand; OPG, osteoprotegerin.

Osim razine izražaja gena, odredili smo i proteinsku razinu čimbenika RANKL i OPG u plazmi i cerebrospinalnom likvoru kontrolnih ispitanika i bolesnika koji boluju od MS. Čimbenik RANKL izražen je i kao membranska i kao topljiva molekula, a posebice ga u topljivom obliku stvaraju aktivirani limfociti T (86). Osim toga, membranske molekule mogu se odcjepljivati s membrane stanica djelovanjem proteolitičkih enzima, tako da je koncentracija topljivog oblika u većini slučajeva dobar pokazatelj ukupne količine čimbenika RANKL (87).

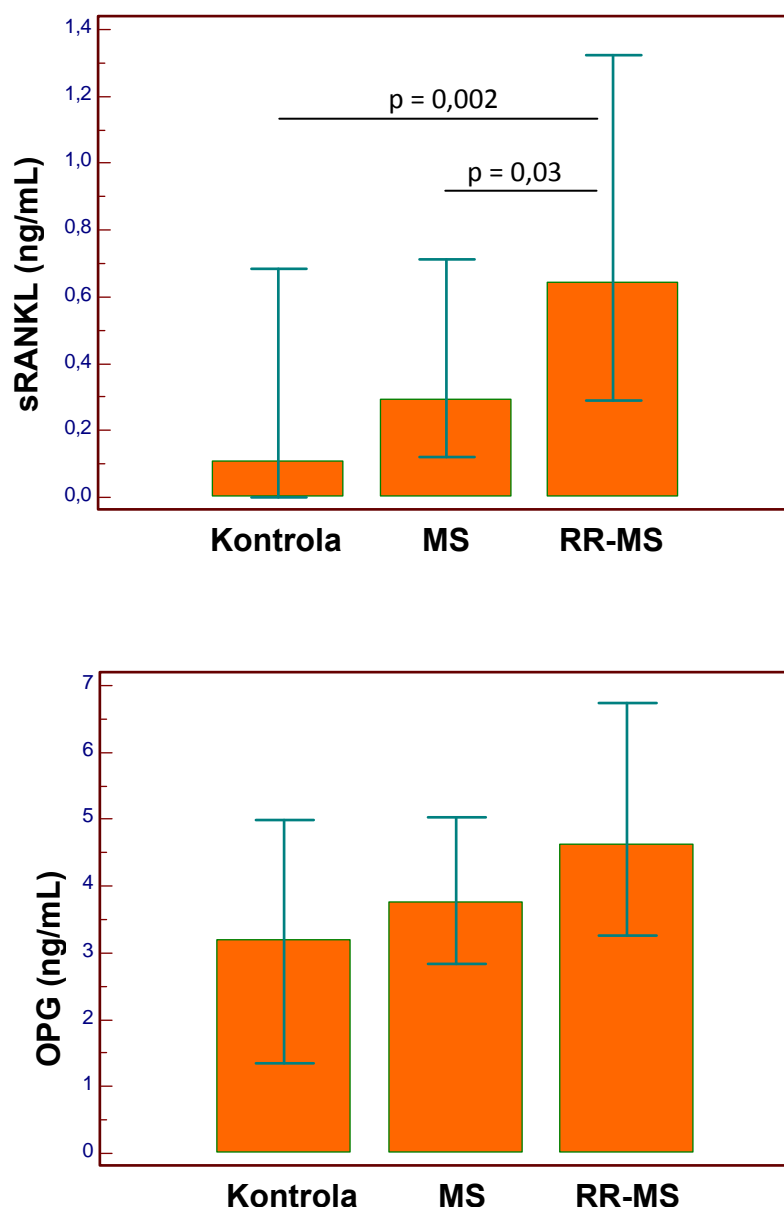
U uzorcima plazme određena je koncentracija navedenih proteina postupkom ELISA za sve tri skupine ispitanika te je utvrđena značajno veća koncentracija topljivog čimbenika RANKL (sRANKL, prema engl. *soluble RANKL*) u uzorcima bolesnika s uznapredovalom RR-MS i u odnosu na kontrolne ispitanike ( $p=0,002$ ) i u odnosu na bolesnike na kliničkom početku MS ( $p=0,03$ ). Nasuprot tome, koncentracija čimbenika OPG podjednaka je u svim analiziranim skupinama (Slika 10). U prilog pretpostavci da je ukupni izražaj čimbenika RANKL razmjeran količini topljivog oblika molekule govori i statistički značajna pozitivna korelacija jačine izražaja gena za RANKL u mononuklearima periferne krvi i koncentracije topljivog čimbenika RANKL u plazmi istih uzoraka ( $\rho = 0,206$ , 95% CI -0,005 do 0,399,  $p = 0,05$ ; Slika 13).

Proteinsku razinu molekula odredili smo i u cerebrospinalnom likvoru, ali samo za skupine zdravih ispitanika i bolesnika na kliničkom početku MS, jer u skupini bolesnika koji boluju od RR-MS punkcija cerebrospinalnog likvora nije učinjena s obzirom da se ne provodi u okviru rutinskog kliničkog postupka praćenja bolesti i nije etički prihvatljiva (Slika 11). Dok između skupina nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji topljivog čimbenika RANKL, koncentracija čimbenika OPG značajno je niža u skupini bolesnika na kliničkom početku MS u odnosu na kontrolne ispitanike ( $p=0,0003$ ).

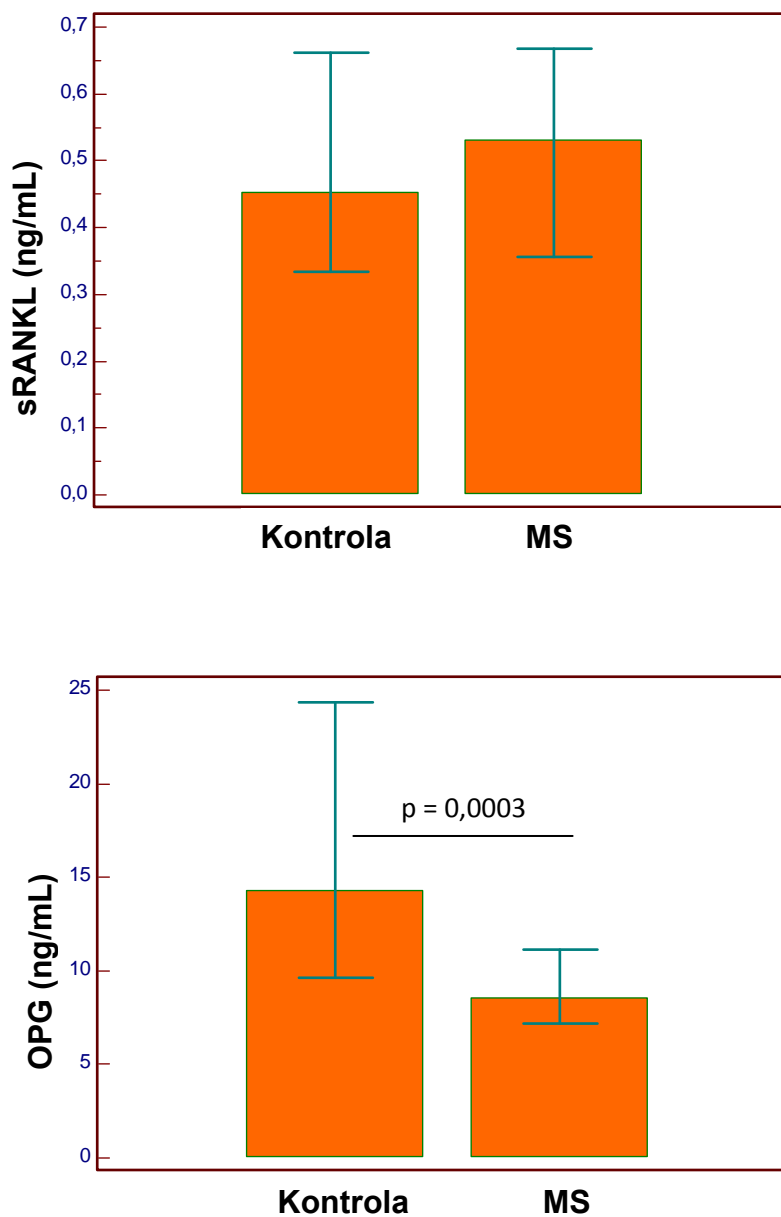
Nadalje, analizirali smo omjer topljivih čimbenika sRANKL i OPG u plazmi i cerebrospinalnoj tekućini. Kako smo prije naveli, taj omjer je pokazatelj biološke dostupnosti čimbenika RANKL s obzirom da OPG djeluje kao neutralizacijski receptor za RANKL i onemogućava njegovo vezanje za aktivacijski receptor RANK izražen na membrani ciljnih stanica (85).

Dok u plazmi bolesnika na kliničkom početku MS nema značajne razlike u omjeru topljivih čimbenika sRANKL/OPG, u cerebrospinalnom je likvoru taj omjer značajno veći ( $p=0,005$ ), ponajprije zbog smanjene koncentracije čimbenika OPG u odnosu na kontrolne ispitanike (Slika 12.). No bolesnici s uznapredovalom RR-MS imaju značajno veći omjer topljivih čimbenika sRANKL i OPG u plazmi ( $p=0,02$ ), što upućuje na zaključak da navedeni čimbenici sudjeluju u patogenezi MS te da se poremećaj njihovog lučenja razvija najprije unutar središnjeg živčanog sustava, a s napredovanjem bolesti može se detektirati i sustavno u cirkulaciji.

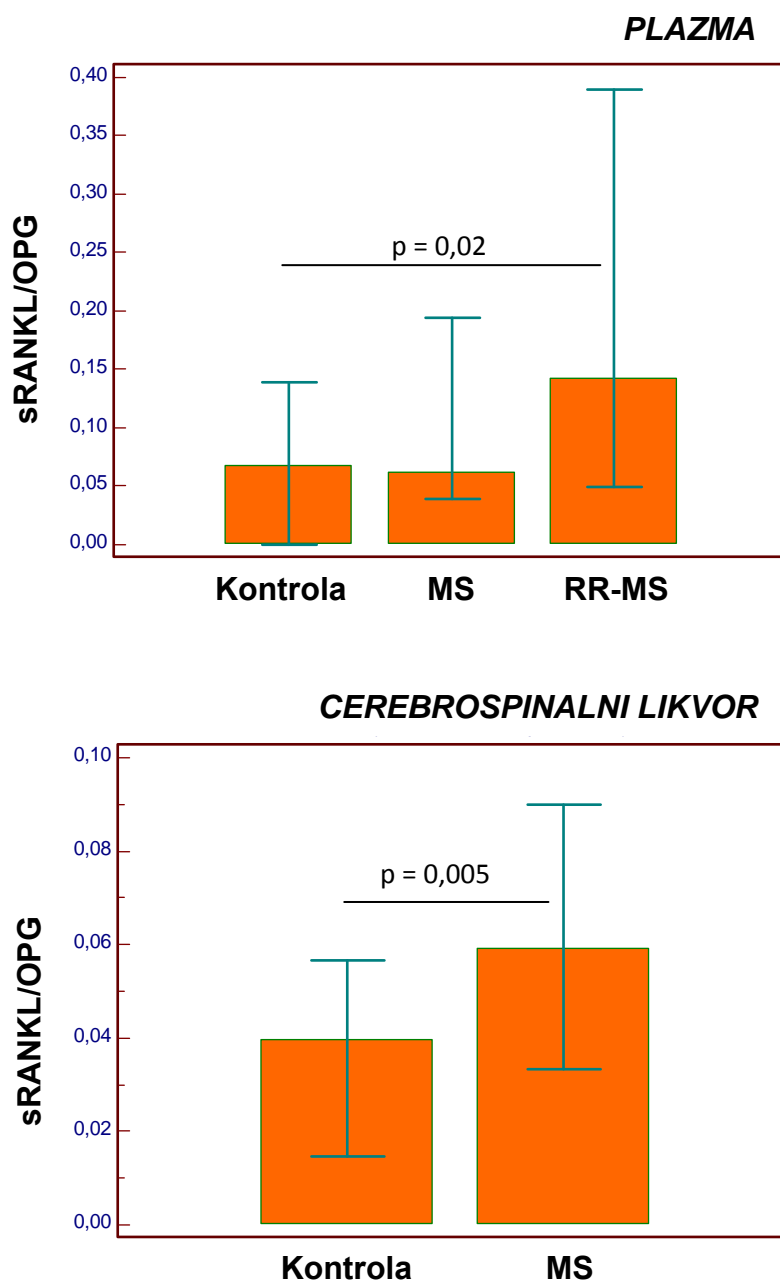
Također smo usporedili odgovarajuće plazmatske i likvorske koncentracije topljivih čimbenika sRANKL i OPG, ali nismo utvrdili njihovu međusobnu značajnu korelaciju. Treba napomenuti da su koncentracije čimbenika OPG bile nekoliko puta veće u cerebrospinalnom likvoru u odnosu na plazmatske koncentracije i u skupini kontrolnih ispitanika i u skupini ispitanika na kliničkom početku MS ( $p<0,0001$  za oboje), dok za koncentraciju topljivog čimbenika sRANKL razlika nije bila toliko naglašena ( $p=0,02$  za kontrolnu skupinu i  $p=0,06$  za skupinu na kliničkom početku MS) (Slike 10 i 11). Navedeni nalazi, zajedno s prethodno opisanim rezultatima, potvrđuju pretpostavku da su u bolesnika na kliničkom početku MS koncentracije tih čimbenika poremećene najprije unutar središnjeg živčanog sustava na mjestu razvoja lezija, što govori u prilog intratekalne regulacije lučenja tih čimbenika.



**Slika 10. Koncentracija topljivih čimbenika RANKL i OPG u plazmi kontrolnih ispitanika i bolesnika koji boluju od multiple skleroze.** Analiza je uključivala kontrolne ispitanike, te dvije skupine bolesnika: bolesnike koji boluju od MS na kliničkom početku bolesti (MS) te bolesnike koji boluju od uznapredovale bolesti relapsno-remitirajućeg kliničkog oblika (RR-MS). Koncentracije proteina analizirane su postupkom ELISA, a dobivene su uporabom standardne krivulje razrjeđenja rekombinantnog proteina, prema uputama proizvođača, i prikazane kao medijan uz interkvartilni raspon za svaku skupinu. Razlika između skupina analizirana je Kruskal-Wallis testom te *post hoc* Mann-Whitney testom uz korekciju po Bonferroniju. Prikazane su samo statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ). RANKL, prema engl. *receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand*; sRANKL; topljivi oblik čimbenika RANKL (prema engl. *soluble RANKL*); OPG, osteoprotegerin.

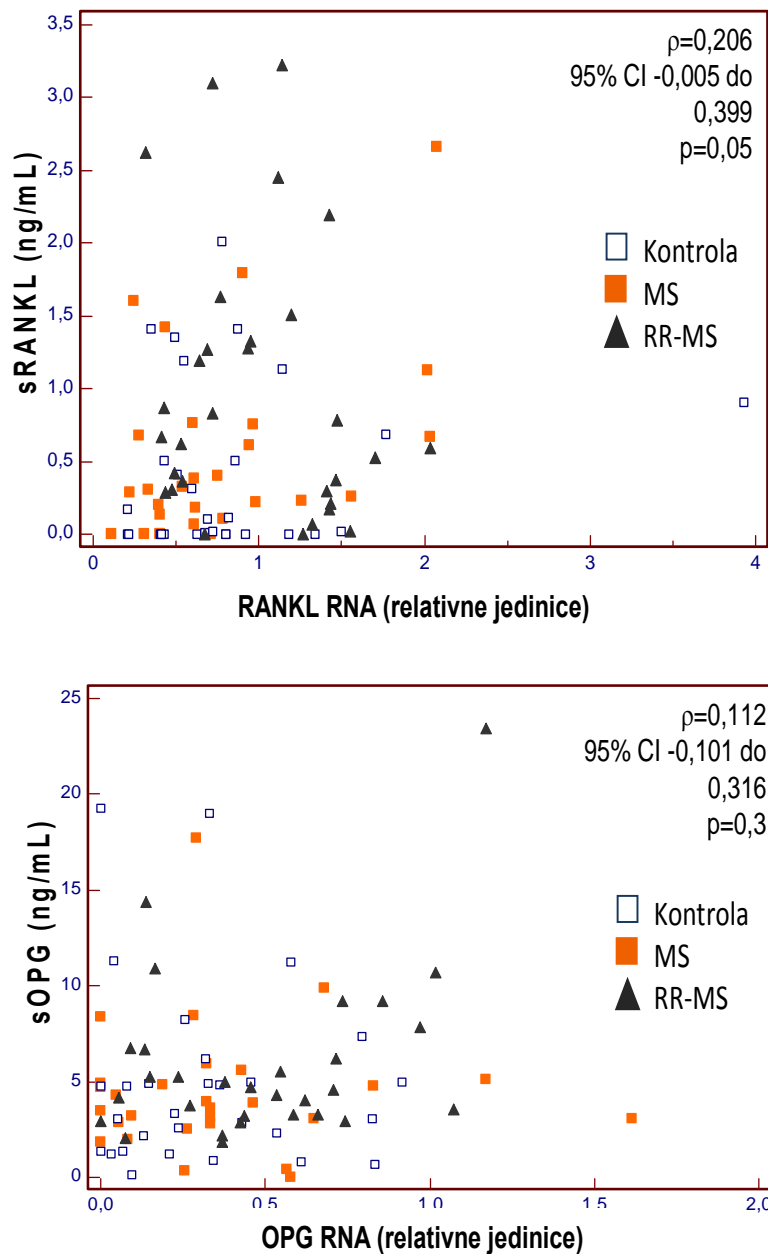


**Slika 11. Koncentracija topljivih čimbenika RANKL i OPG u cerebrospinalnom likvoru kontrolnih ispitanika i bolesnika koji boluju od multiple skleroze.** Analiza je uključivala kontrolne ispitanike te skupinu bolesnika koji boluju od MS na kliničkom početku bolesti (MS). Koncentracije proteina analizirane su postupkom ELISA, a dobivene su uporabom standardne krivulje razrjeđenja rekombinantnog proteina, prema uputama proizvođača, i prikazane kao medijan uz interkvartilni raspon za svaku skupinu. Razlika između skupina analizirana je Mann-Whitney testom. Prikazane su samo statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ). RANKL, prema engl. *receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand*; sRANKL; topljivi oblik čimbenika RANKL (prema engl. *soluble*); OPG, osteoprotegerin.



**Slika 12. Omjer topljivih čimbenika RANKL/OPG u plazmi i cerebrospinalnom likvoru kontrolnih ispitanika i bolesnika koji boluju od multiple skleroze.** Analiza je uključivala kontrolne ispitanike te dvije skupine bolesnika: bolesnike koji boluju od MS na kliničkom početku bolesti (MS) te bolesnike koji boluju od uznapredovale bolesti relapsno-remitirajućeg kliničkog oblika (RR-MS; samo za plazmu). Rezultati su prikazani kao medijan (uz interkvartilni raspon), a razlika između skupina testirana je Kruskal-Wallis testom za koncentracije u plazmi, te Mann-Whitney testom za koncentracije u likvoru. Prikazane su samo statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ). RANKL, prema engl. *receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand*; sRANKL; topljivi oblik čimbenika RANKL (prema engl. *soluble*); OPG, osteoprotegerin.





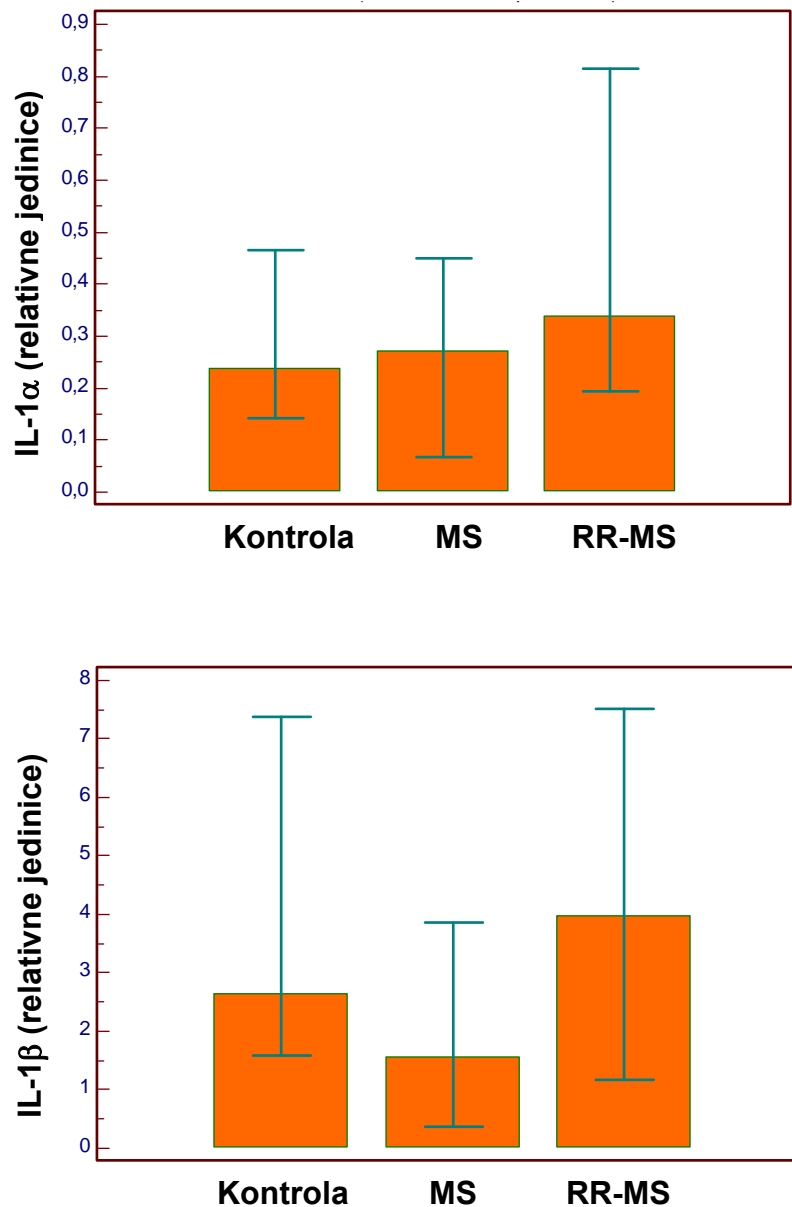
**Slika 13. Korelacija izražaja gena i plazmatskih koncentracija čimbenika RANKL i OPG u uzorcima periferne krvi kontrolnih ispitanika i bolesnika koji boluju od multiple skleroze.** Izražaj gena analiziran je u mononuklearnim stanicama periferne krvi postupkom qPCR, te izražen u obliku relativne količine RNA. Razina proteina u plazmi određena je postupkom ELISA, te izražena koncentracijom ng/mL. Odgovarajuće vrijednosti, izmjerene u pojedinog kontrolnog ispitanika i bolesnika, statistički su analizirane testom korelacije ranga i prikazane Spearmanovim koeficijentom rho ( $\rho$ ) s 95%-tnim intervalom pouzdanosti (95% CI, prema engl. *confidence interval*). Za razinu statističke značajnosti postavljena je vrijednost  $p=0,05$ . RANKL, prema engl. *receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand*; OPG, osteoprotegerin.

### 5.3. Citokini i kemokini u krvi i cerebrospinalnom likvoru

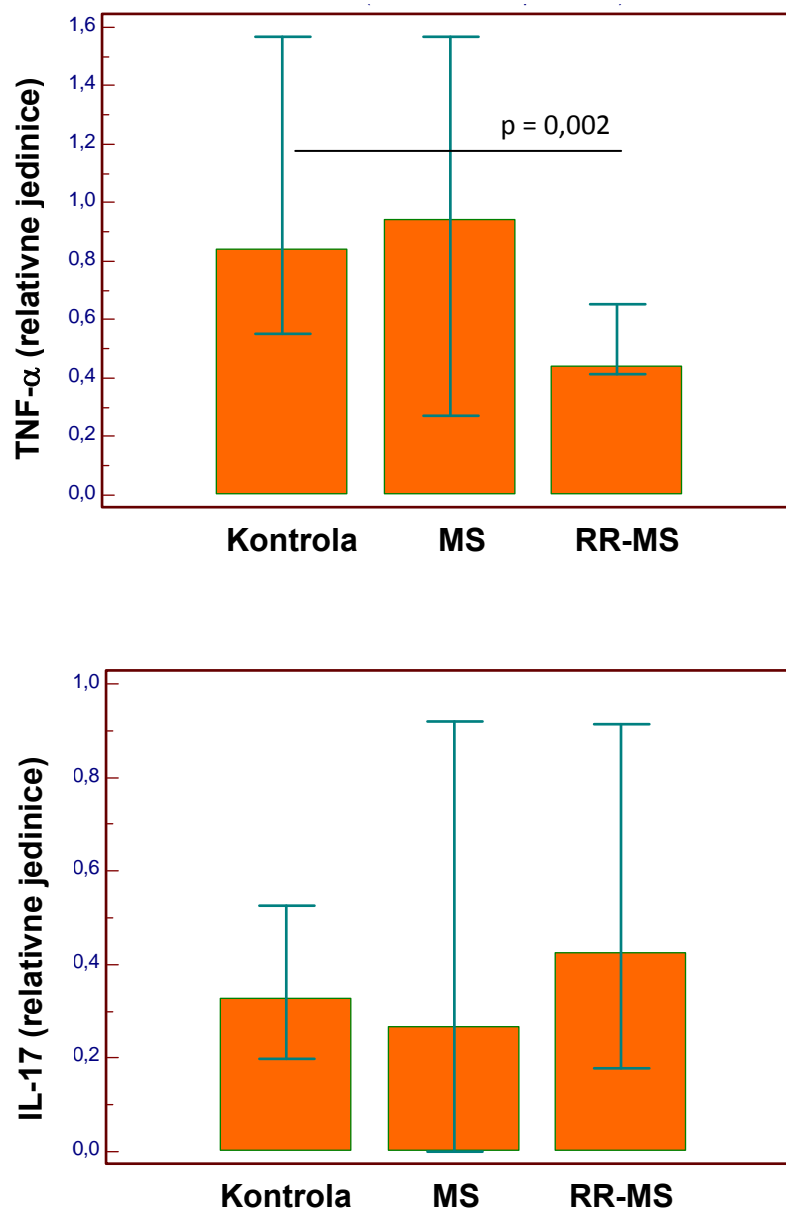
Brojni proupalni i imunosupresivni citokini i kemokini koji sudjeluju u patogenezi MS djeluju i na izražaj čimbenika osovine RANKL/RANK/OPG te, posljedično, na aktivnost osteoklasta i koštanu razgradnju (139). Stoga je cilj druge skupine pokusa bio utvrditi profil izražaja gena za odabrane proupalne (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-17) i imunosupresivne (IL-4, IL-10) citokine te kemokine (CCL2 i CXCL12) u mononuklearnim stanicama periferne krvi bolesnika na kliničkom početku MS te ga usporediti s profilom izražaja gena u uzorcima kontrolne skupine i u uzrocima bolesnika s uznapredovanom RR-MS.

Rezultati analize izražaja gena postupkom qPCR pokazali su da nema značajne razlike između skupina zdravih ispitanika i bolesnika na kliničkom početku MS za proupalne citokine (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-17; Slika 14,15). Nasuprot tome, izražaj gena za imunosupresivni citokin IL-10 bio je značajno niži ( $p=0,02$ ) u odnosu na kontrolne ispitanike (Slika 16). Osim toga izražaj gena za CCL2, koji privlači monocite, dendritične stanice i memorijske limfocite T na mjesto upalnog procesa (46), značajno je veći u bolesnika na kliničkom početku MS u odnosu na kontrolne ispitanike ( $p=0,03$ ; Slika 17).

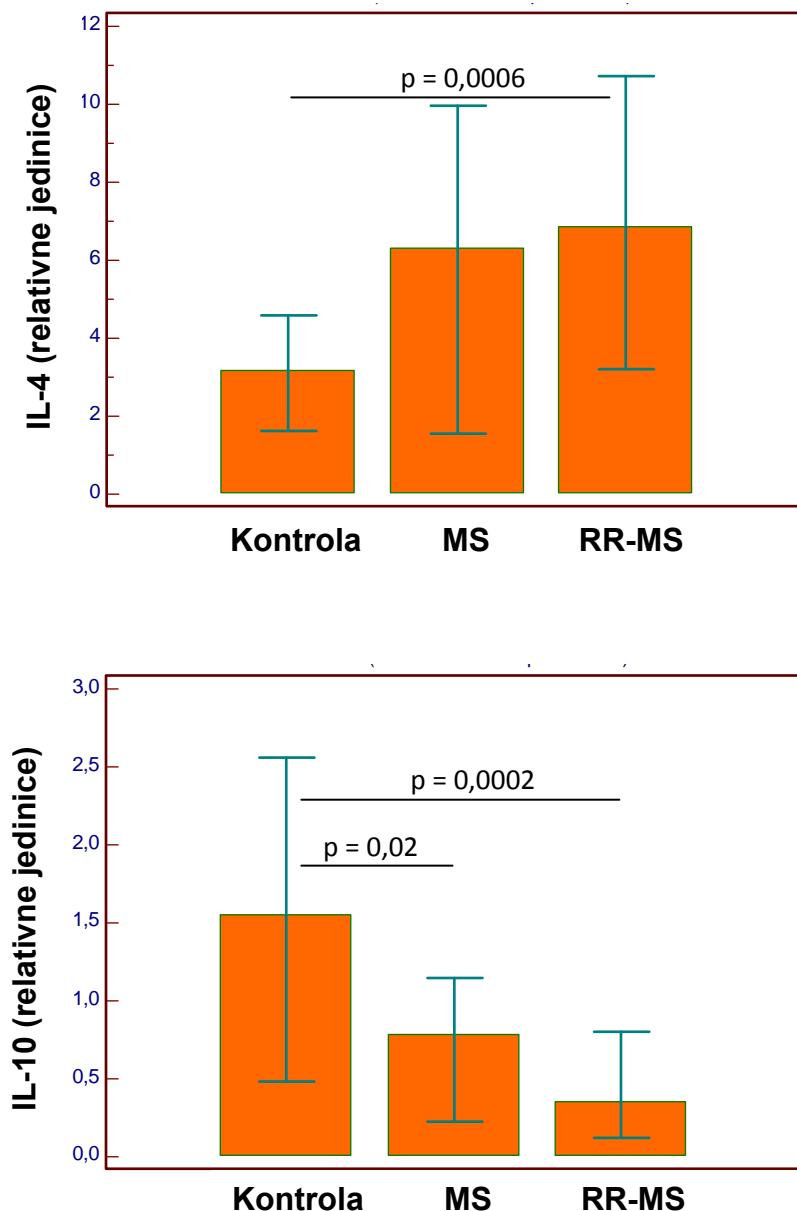
U odnosu na bolesnike na kliničkom početku MS, izražaj gena u skupini bolesnika s uznapredovalom RR-MS razlikovao se za veći broj analiziranih citokina i kemokina (Slike 15-17). Tako se izražaj gena za imunosupresivne citokine značajno razlikovao, te je bio veći za IL-4 ( $p=0,0006$ ), a manji za IL-10 ( $p=0,0002$ ) u bolesnika s uznapredovalom RR-MS u odnosu na kontrolne ispitanike (Slika 16). Uz to je i izražaj proupalnog citokina TNF- $\alpha$  bio značajno manji u odnosu na kontrolne ispitanike ( $p=0,002$ ), moguće zbog primijenjene terapije (Slika 15). Nasuprot tome izražaj gena za kemokine CCL2 i CXCL12 bio je značajno veći u skupini bolesnika s uznapredovalom RR-MS u odnosu na kontrolne ispitanike ( $p<0,0001$  za CCL2 i  $p=0,005$  za CXCL12), ali i u odnosu na klinički početak MS ( $p<0,0001$  za CCL2 i  $p=0,03$  za CXCL12; Slika 17).



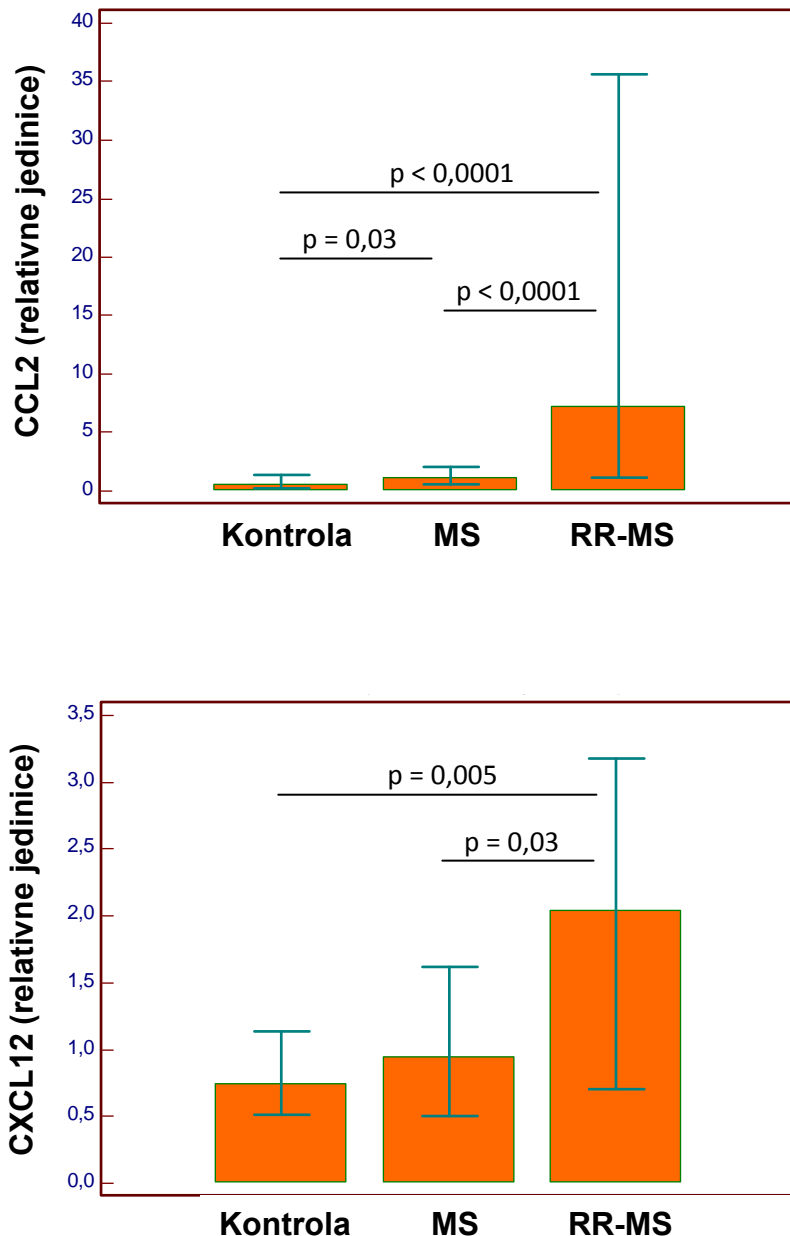
**Slika 14. Izražaj gena za citokine IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$  u mononuklearnim stanicama periferne krvi kontrolnih ispitanika i bolesnika koji boluju od multiple skleroze.** Analiza je uključivala kontrolne ispitanike te dvije skupine bolesnika: bolesnike koji boluju od MS na kliničkom početku bolesti (MS) te bolesnike koji boluju od uznapredovale bolesti relapsno-remitirajućeg kliničkog oblika (RR-MS). RNA je izolirana iz mononuklearnih stanica periferne krvi, prepisana u cDNA i analizirana postupkom qPCR. Vrijednosti izražaja gena dobivene su uporabom standardne krivulje izražaja ciljnoga gena u uzorku za kalibraciju (cDNA iz kontrolnog uzorka) i normalizirane u odnosu na količinu cDNA za GAPDH („endogena“ kontrola), a prikazane su kao medijan uz interkvartilni raspon za svaku skupinu. Razlika između skupina analizirana je Kruskal-Wallis testom te *post hoc* Mann-Whitney testom uz korekciju po Bonferroniju. Nije bilo značajne razlike između skupina.



**Slika 15. Izražaj gena za citokine TNF- $\alpha$  i IL-17 u mononuklearnim stanicama periferne krvi kontrolnih ispitanika i bolesnika koji boluju od multiple skleroze.** Analiza je uključivala kontrolne ispitanike te dvije skupine bolesnika: bolesnike koji boluju od MS na kliničkom početku bolesti (MS) te bolesnike koji boluju od uznapredovale bolesti relapsno-remitirajućeg kliničkog oblika (RR-MS). RNA je izolirana iz mononuklearnih stanica periferne krvi, prepisana u cDNA i analizirana postupkom qPCR. Vrijednosti izražaja gena dobivene su uporabom standardne krivulje izražaja ciljnoga gena u uzorku za kalibraciju (cDNA iz kontrolnog uzorka) i normalizirane u odnosu na količinu cDNA za GAPDH („endogena“ kontrola), a prikazane su kao medijan uz interkvartilni raspon za svaku skupinu. Razlika između skupina analizirana je Kruskal-Wallis testom te *post hoc* Mann-Whitney testom uz korekciju po Bonferroniju. Prikazane su samo statistički značajne razlike između skupina ( $p < 0,05$ ).



**Slika 16. Izražaj gena za citokine IL-4 i IL-10 u mononuklearnim stanicama periferne krvi kontrolnih ispitanika i bolesnika koji boluju od multiple skleroze.** Analiza je uključivala kontrolne ispitanike te dvije skupine bolesnika: bolesnike koji boluju od MS na kliničkom početku bolesti (MS) te bolesnike koji boluju od uznapredovale bolesti relapsno-remitirajućeg kliničkog oblika (RR-MS). RNA je izolirana iz mononuklearnih stanica periferne krvi, prepisana u cDNA i analizirana postupkom qPCR. Vrijednosti izražaja gena dobivene su uporabom standardne krivulje izražaja ciljnoga gena u uzorku za kalibraciju (cDNA iz kontrolnog uzorka) i normalizirane u odnosu na količinu cDNA za GAPDH („endogena“ kontrola), a prikazane su kao medijan uz interkvartilni raspon za svaku skupinu. Razlika između skupina analizirana je Kruskal-Wallis testom te *post hoc* Mann-Whitney testom uz korekciju po Bonferroniju. Prikazane su samo statistički značajne razlike između skupina ( $p < 0,05$ ).



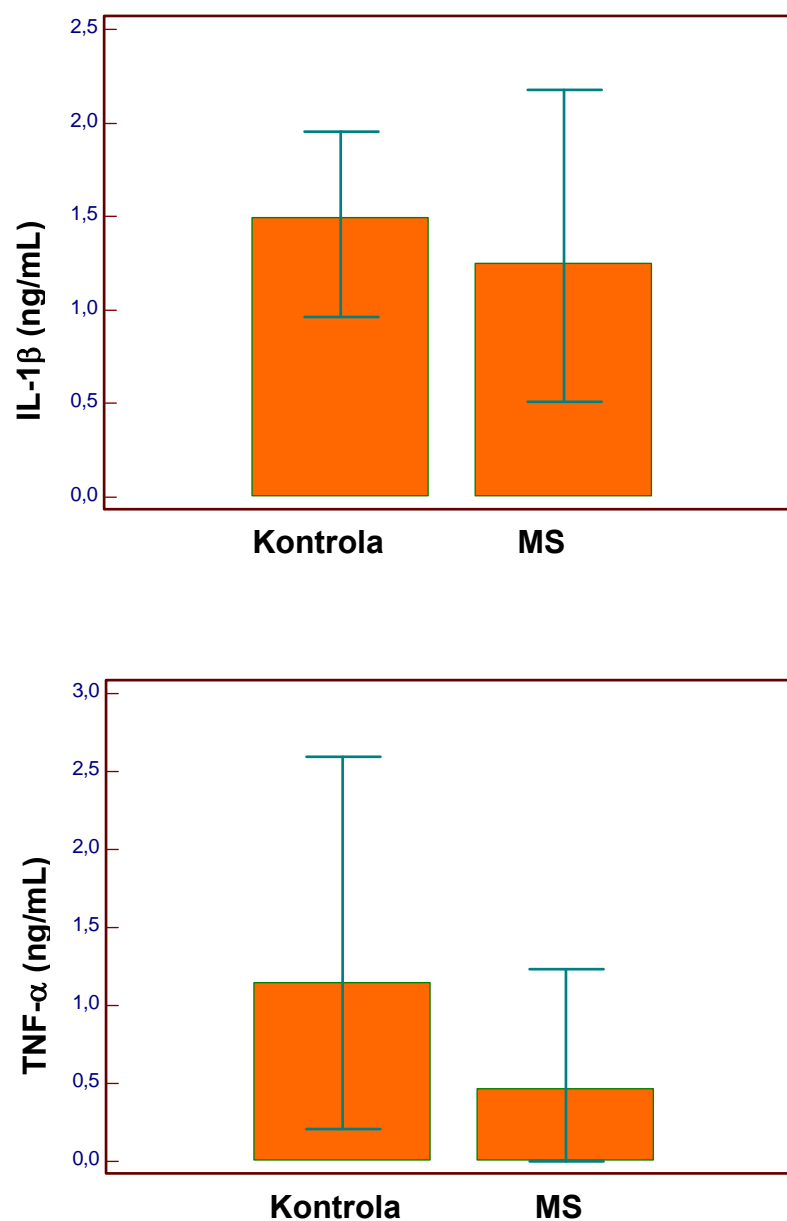
**Slika 17. Izražaj gena za kemokine CCL2 i CXCL12 u mononuklearnim stanicama periferne krvi kontrolnih ispitanika i bolesnika koji boluju od multiple skleroze.** Analiza je uključivala kontrolne ispitanike te dvije skupine bolesnika: bolesnike koji boluju od MS na kliničkom početku bolesti (MS) te bolesnike koji boluju od uznapredovale bolesti relapsno-remitirajućeg kliničkog oblika (RR-MS). RNA je izolirana iz mononuklearnih stanica periferne krvi, prepisana u cDNA i analizirana postupkom qPCR. Vrijednosti izražaja gena dobivene su uporabom standardne krivulje izražaja ciljnoga gena u uzorku za kalibraciju (cDNA iz kontrolnog uzorka) i normalizirane u odnosu na količinu cDNA za GAPDH („endogena“ kontrola), a prikazane su kao medijan uz interkvartilni raspon za svaku skupinu. Razlika između skupina analizirana je Kruskal-Wallis testom te *post hoc* Mann-Whitney testom uz korekciju po Bonferroniju. Prikazane su samo statistički značajne razlike između skupina ( $p < 0,05$ ).

Osim razine izražaja gena, odredili smo i proteinsku razinu proupalnih citokin  $\text{TNF-}\alpha$  i  $\text{IL-1}\beta$  za koje se zna da sudjeluju u patogenezi MS. Koncentracije tih citokina mogu biti povišene sustavno u cirkulaciji, podrijetlom aktiviranih limfocita T i monocita perfirene krvi, ali i lokalno, unutar tekalnog prostora, gdje ih stvaraju aktivirane stanice mikroglije i limfociti T infiltrirani na periferiji demijelinizacijskih lezija (153).

U uzorcima plazme određena je koncentracija  $\text{TNF-}\alpha$  i  $\text{IL-1}\beta$  postupkom ELISA za kontrolne ispitanike i bolesnike na kliničkom početku MS, ali nije utvrđena značajna razlika u koncentraciji tih proupalnih citokina u našem setu uzoraka (Slika 18).

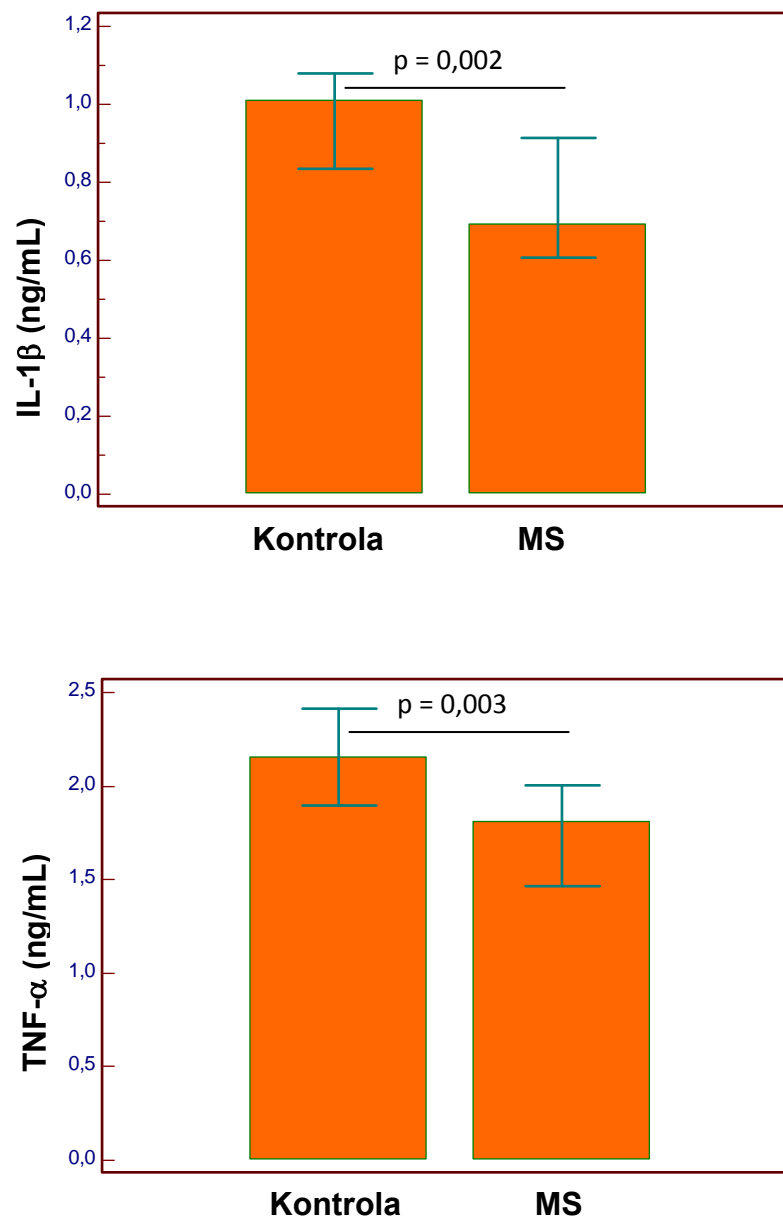
Proteinsku razinu  $\text{TNF-}\alpha$  i  $\text{IL-1}\beta$  odredili smo i u cerebrospinalnom likvoru za skupine zdravih ispitanika i bolesnika na kliničkom početku MS (Slika 19). Zanimljivo je da je, nasuprot očekivanju, koncentracija tih proupalnih citokina bila niža u skupini bolesnika nego u kontrolnih ispitanika ( $p=0,002$  za  $\text{IL-1}\beta$  i  $p=0,003$  za  $\text{TNF-}\alpha$ ). Navedeni rezultat mogao bi predstavljati kompenzacijski mehanizam supresije proupalnih citokina kao pokušaj obuzdavanja kroničnog upalnog procesa tijekom razvoja MS (154). S druge strane, navedeni bi citokini mogli biti vezani za receptore na ciljnim stanicama (stanice vaskulanog endotela, stanice mikroglije, limfocite T) unutar ili oko patoloških lezija, pa je stoga koncentracija topljivih molekula (dostupnih mjerenju postupkom ELISA) u cerebrospinalnom likvoru snižena. Nadalje treba napomenuti da su koncentracije navedenih citokina vrlo niske (do 2,5 ng/mL) te je, bez obzira što je odabran set kemikalija ELISA visoke osjetljivosti (Platinum sensitive ELISA, eBioscience), njihova koncentracija oko praga osjetljivosti uporabljenog seta (i nije detektirana u dijelu uzoraka) te bi mjerenja u budućim analizama trebalo ponoviti uporabom još osjetljivijeg seta ELISA.

Također smo usporedili odgovarajuće plazmatske i likvorske koncentracije proupalnih citokina  $\text{IL-1}\beta$  i  $\text{TNF-}\alpha$ , ali nismo utvrdili međusobnu značajnu korelaciju, što govori u prilog lokalne (intratekalne) regulacije lučenja tih citokina.



**Slika 18. Koncentracija citokina IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  u plazmi kontrolnih ispitanika i bolesnika koji boluju od multiple skleroze.** Analiza je uključivala kontrolne ispitanike te skupinu bolesnika koji boluju od MS na kliničkom početku bolesti (MS). Koncentracije proteina analizirane su postupkom ELISA, a dobivene su uporabom standardne krivulje razrjeđenja rekombinantnog proteina, prema uputama proizvođača, i prikazane kao medijan uz interkvartilnim raspon za svaku skupinu. Razlika između skupina analizirana je Mann-Whitney testom. Nije bilo značajne razlike između skupina.



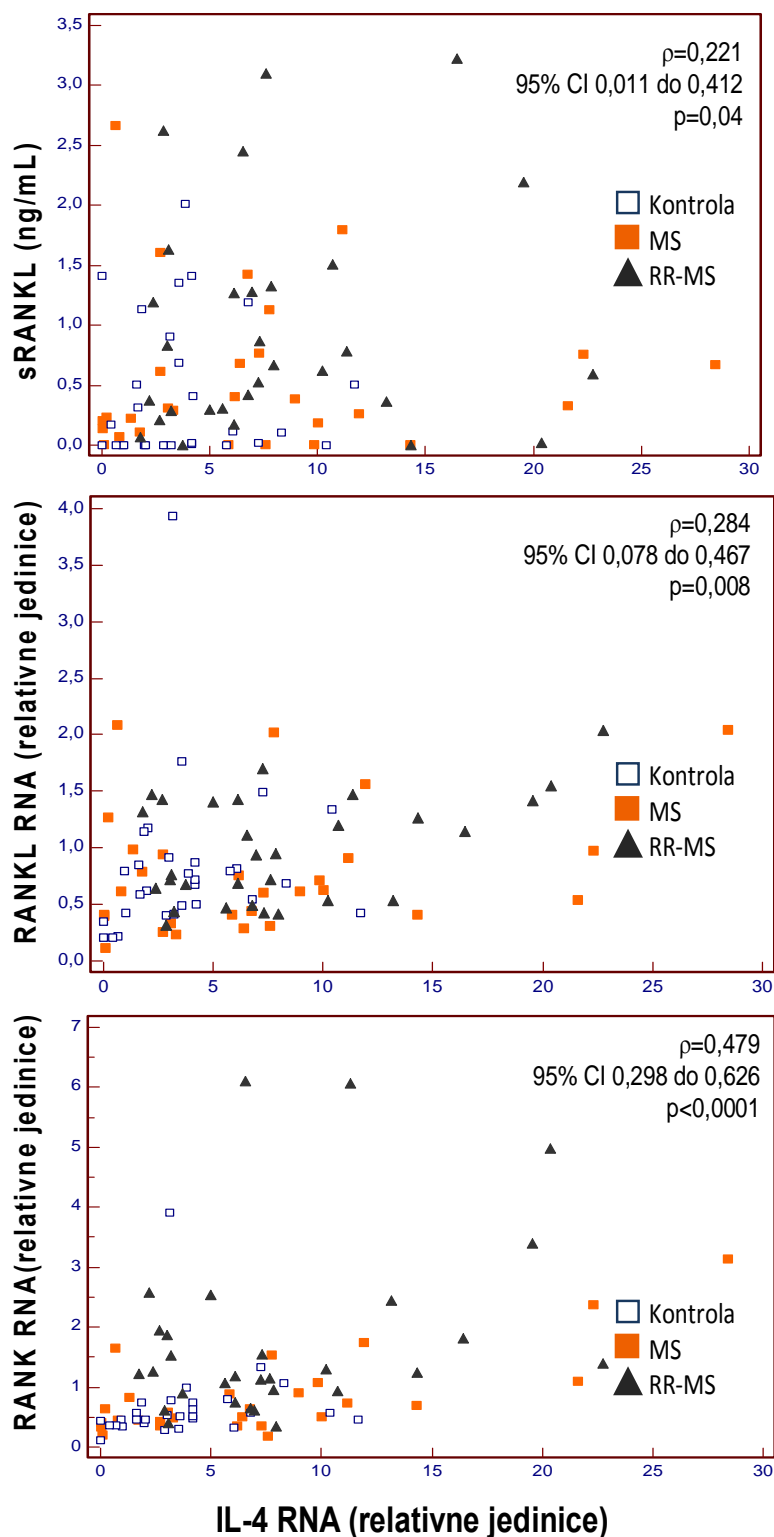


**Slika 19. Koncentracija citokina IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  u cerebrospinalnom likvoru kontrolnih ispitanika i bolesnika koji boluju od multiple skleroze.** Analiza je uključivala kontrolne ispitanike te skupinu bolesnika koji boluju od MS na kliničkom početku bolesti (MS). Koncentracije proteina analizirane su postupkom ELISA, a dobivene su uporabom standardne krivulje razrjeđenja rekombinantnog proteina, prema uputama proizvođača, i prikazane kao medijan uz interkvartilnim raspon za svaku skupinu. Razlika između skupina analizirana je Mann-Whitney testom. Prikazane su samo statistički značajne razlike između skupina ( $p < 0,05$ ).

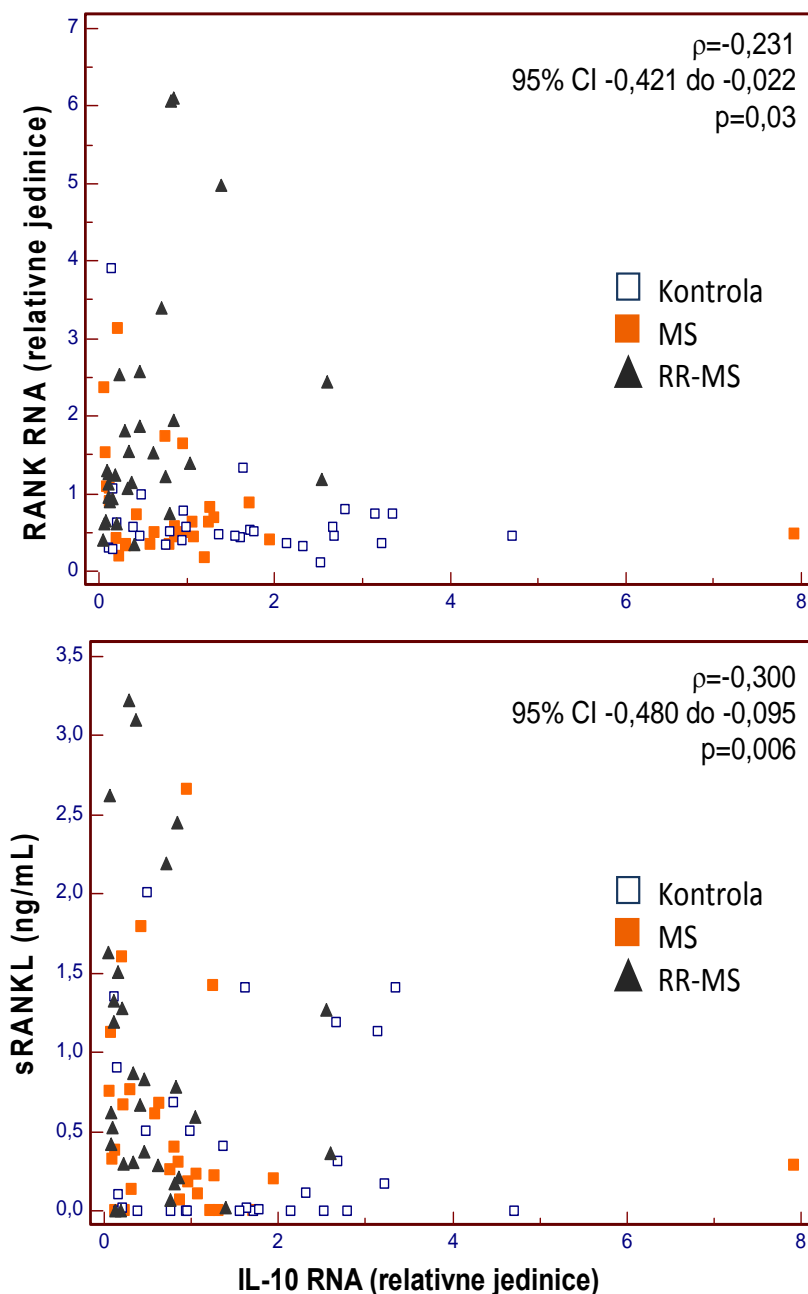
#### **5.4. Korelacije čimbenika osovine RANKL/RANK/OPG s izražajem proupalnih i imunosupresivnih medijatora**

Na izražaj čimbenika osovine RANKL/RANK/OPG regulacijski djeluju brojni proupalni i imunosupresivni medijatori, koji tako neizravno reguliraju aktivnost osteoklasta i koštani metabolizam (87). Stoga je sljedeći cilj bio analizirati povezanost između izražaja odabranih citokina i kemokina u mononuklearnim stanicama periferne krvi u kontrolnih ispitanika i bolesnika koji boluju od MS sa izražajem gena za čimbenike osovine RANKL/RANK/OPG te plazmatskom koncentracijom topljivih čimbenika sRANKL i OPG.

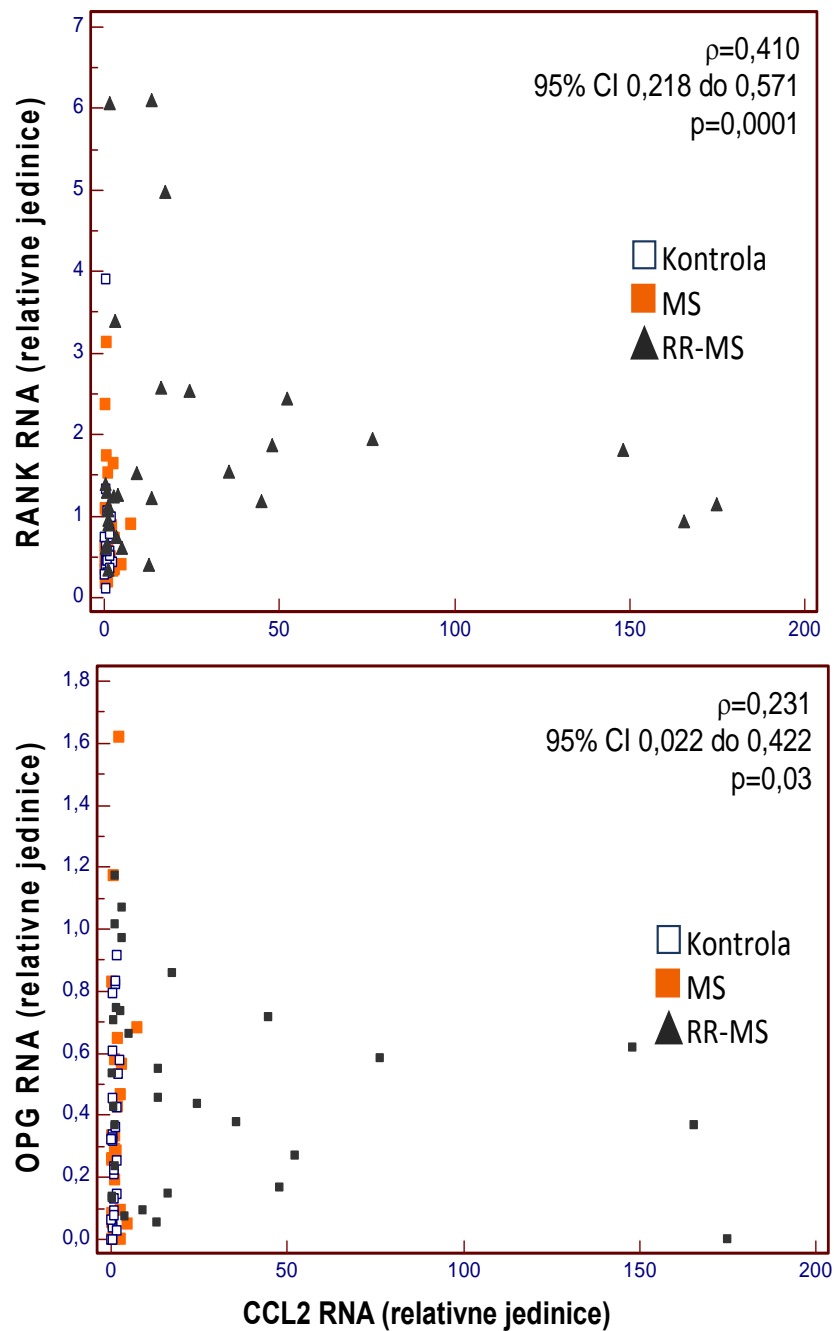
Dok provedenom analizom nismo utvrdili statistički značajnu povezanost čimbenika RANKL, RANK i OPG na genskoj i proteinskoj razini s izražajem gena za proupalne citokine (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i IL-17), izražaj navedenih čimbenika značajno je povezan s izražajem kemokina i imunosupresivnih citokina. Tako vrijednosti izražaj gena za IL-4 značajno pozitivno koreliraju s izražajem gena za aktivacijski receptor RANK ( $p < 0,0001$ ) i njegov ligand RANKL ( $p = 0,008$ ), a također i s koncentracijom topljive molekule sRANKL ( $p = 0,04$ ). Nasuprot tome, izražaj gena za IL-10 značajno negativno korelira s izražajem gena za aktivacijski receptor RANK ( $p = 0,03$ ) i koncentracijom topljive molekule sRANKL ( $p = 0,006$ ). Vrijednosti izražaja gena za kemokine CCL2 i CXCL12 pozitivno koreliraju s čimbenicima osovine RANKL/RANK/OPG, i to izražaj gena za CCL2 s izražajem gena za aktivacijski receptor RANK ( $p < 0,0001$ ) i neutralizacijski receptor OPG ( $p = 0,03$ ), a izražaj gena za CXCL12 s izražajem gena za aktivacijski receptor RANK ( $p < 0,0001$ ) i njegov ligand RANKL ( $p = 0,001$ ). Iz navedenih rezultata možemo zaključiti da su kemokini CCL2 i CXCL12, koji su potaknuti tijekom upalnog procesa (45,155) i citokin IL-4, koji uz imunosupresivni učinak potiče limfocite B i lučenje protutijela čime pridonosi patogenezi MS (156), povezani sa stimulacijom osovine RANKL/RANK/OPG, dok je imunosupresivni citokin IL-10 povezan sa kočenjem aktivnosti te osovine (Slike 20-24).



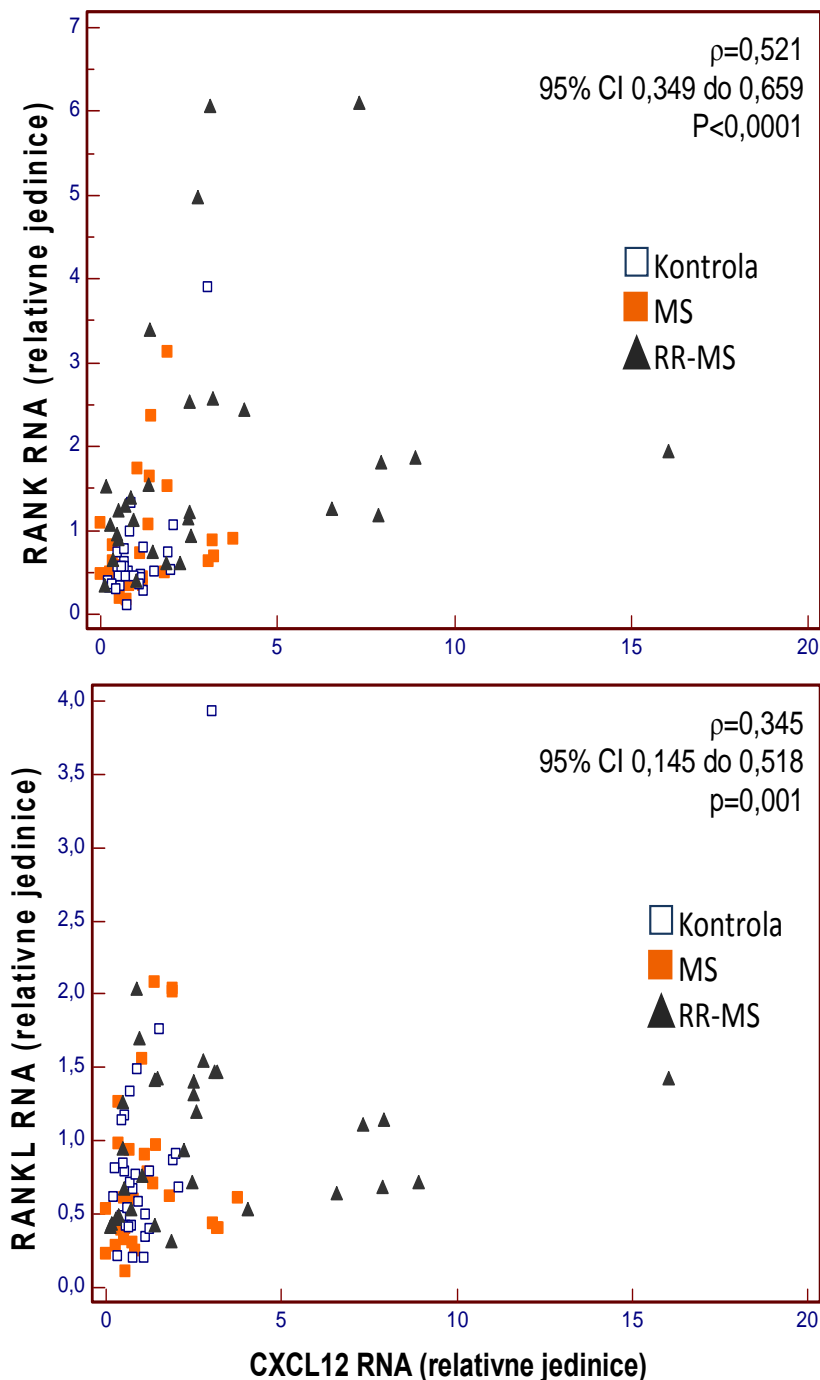
**Slika 20. Korelacija izražaja čimbenika RANKL i receptora RANK s izražajem gena za IL-4 u uzorcima periferne krvi kontrolnih ispitanika i bolesnika koji boluju od multiple skleroze.** Izražaj gena analiziran je u mononuklearnim stanicama periferne krvi postupkom qPCR te izražen u obliku relativne količine RNA. Razina proteina u plazmi određena je postupkom ELISA, te izražena koncentracijom ng/mL. Odgovarajuće vrijednosti, izmjerene u pojedinog kontrolnog ispitanika i bolesnika, statistički su analizirane testom korelacije ranga i prikazane Spearmanovim koeficijentom rho ( $\rho$ ) s 95%-tnim intervalom pouzdanosti (95% CI, prema engl. *confidence interval*). Za razinu statističke značajnosti postavljena je vrijednost  $p=0,05$ . RANK, prema engl. *receptor activator of NF- $\kappa$ B*; RANKL, RANK ligand.



**Slika 21. Korelacija izražaja čimbenika RANKL i receptora RANK s izražajem gena za IL-10 u uzorcima periferne krvi kontrolnih ispitanika i bolesnika koji boluju od multiple skleroze.** Izražaj gena analiziran je u mononuklearnim stanicama periferne krvi postupkom qPCR te izražen u obliku relativne količine RNA. Razina proteina u plazmi određena je postupkom ELISA, te izražena koncentracijom ng/mL. Odgovarajuće vrijednosti, izmjerene u pojedinog kontrolnog ispitanika i bolesnika, statistički su analizirane testom korelacije ranga i prikazane Spearmanovim koeficijentom rho ( $\rho$ ) s 95%-tnim intervalom pouzdanosti (95% CI, prema engl. *confidence interval*). Za razinu statističke značajnosti postavljena je vrijednost  $p=0,05$ . RANK, prema engl. *receptor activator of NF- $\kappa$ B*; RANKL, RANK ligand.



**Slika 22. Korelacija izražaja čimbenika OPG i receptora RANK s izražajem gena za CCL2 u uzorcima periferne krvi kontrolnih ispitanika i bolesnika koji boluju od multiple skleroze.** Izražaj gena analiziran je u mononuklearnim stanicama periferne krvi postupkom qPCR te izražen u obliku relativne količine RNA. Odgovarajuće vrijednosti, izmjerene u pojedinog kontrolnog ispitanika i bolesnika, statistički su analizirane testom korelacije ranga i prikazane Spearmanovim koeficijentom rho ( $\rho$ ) s 95%-tnim intervalom pouzdanosti (95% CI, prema engl. *confidence interval*). Za razinu statističke značajnosti postavljena je vrijednost  $p=0,05$ . RANK, prema engl. *receptor activator of NF- $\kappa$ B*; OPG, osteoprotegerin.



**Slika 23. Korelacija izražaja čimbenika RANKL i receptora RANK s izražajem gena za CXCL12 u uzorcima periferne krvi kontrolnih ispitanika i bolesnika koji boluju od multiple skleroze.** Izražaj gena analiziran je u mononuklearnim stanicama periferne krvi postupkom qPCR te izražen u obliku relativne količine RNA. Odgovarajuće vrijednosti, izmjerene u pojedinog kontrolnog ispitanika i bolesnika, statistički su analizirane testom korelacije ranga i prikazane Spearmanovim koeficijentom rho ( $\rho$ ) s 95%-tnim intervalom pouzdanosti (95% CI, prema engl. *confidence interval*). Za razinu statističke značajnosti postavljena je vrijednost  $p=0,05$ . RANK, prema engl. *receptor activator of NF- $\kappa$ B*; RANKL, RANK ligand.

## **5.5. Korelacije čimbenika osovine RANKL/RANK/OPG s kliničkom procjenom aktivnosti bolesti i pokazateljima koštane pregradnje**

Zadnji set analiza proveden je s ciljem da se utvrdi povezanost profila čimbenika osovine RANKL/RANK/OPG s kliničkom procjenom težine bolesti i osnovnim biokemijskim pokazateljima intenziteta koštanog metabolizma (koncentracija anorganskog fosfora, koncentracija kalcija i aktivnost ukupne alkalne fosfataze) u bolesnika na kliničkom početku MS.

Težina bolesti klinički je procijenjena bodovanjem EDSS (ljestvica 0 do 10), koje u obzir uzima stupanj neurološkog oštećenja i pokretnost bolesnika (Tablica 2). U skupini bolesnika na kliničkom početku MS iznosila je od 0,5 do 4 (medijan 1,8), što predstavlja bolesnike s blagim do umjerenim neurološkim ispadima koji su još uvijek samostalno pokretni.

Od laboratorijskih parametara u serumu su određene koncentracije kalcija i anorganskog fosfora biokemijskim postupkom, a u svih ispitanika bile su unutar fizioloških vrijednosti (Tablica 3). Povišene serumske vrijednosti koncentracija kalcija i fosfata mogu biti pokazatelj pojačane koštane razgradnje, jer se navedene tvari oslobađaju iz razgrađenog koštanog matriksa (157).

Aktivnost ukupne alkalne fosfataze određena je kolorimetrijskim postupkom (158) te je u nekih bolesnika na kliničkom početku MS imala snižene vrijednosti (u 36% žena i 56% muškaraca) (Tablica 4). Enzim je prisutan u više oblika u raznim tkivima (u epitelu tankog crijeva, bubrežnim tubulima, kostima, jetri, placenti i leukocitima), a koštani i jetreni oblici alkalne fosfataze, koji su najzastupljeniji u serumu, nastaju posttranslacijskim modifikacijama (stupnjem glikozilacije tkivno-nespecifičnog genskog produkta (159)). Ti oblici ne mogu se razlikovati klasičnim biokemijskim postupkom određivanja, pa se očekuje da je u serumu

odraslih zdravih osoba oko polovice ukupne aktivnosti alkalne fosfataze podrijetlom iz jetre, a druga polovica iz kostiju (dok u serumu djece i adolescenata prevladava koštani oblik). U raznim bolestima koje zahvaćaju navedene organe dolazi do porasta katalitičke koncentracije alkalne fosfataze u serumu, ali u slučajevima kada je bolest jetre isključena, ukupna aktivnost alkalne fosfataze ima kliničku vrijednost, odnosno daje dobru informaciju o intenzitetu koštane izgradnji.

U prijašnjim odjeljcima prikazano je da u bolesnika na kliničkom početku MS postoji poremećen izražaj čimbenika osovine RANKL/RANK/OPG, posebice značajno niža koncentracija topljivog čimbenika OPG u cerebrospinalnom likvoru i značajno povećan omjer sRANKL/OPG u odnosu na kontrolne ispitanike. Analizom povezanosti izražaja čimbenika te osovine i kliničke procjene težine bolesti utvrđena je umjerena negativna korelacija plazmatske koncentracije čimbenika OPG ( $\rho=-0,325$ ,  $p=0,09$ ) i slaba negativna korelacija likvorske koncentracije čimbenika OPG ( $\rho=-0,199$ ,  $p=0,2$ ) sa stupnjem kliničke aktivnosti prikazane EDSS-bodovanjem (Slika 24), što bi upućivalo na negativnu povezanost tih dvaju varijabli.

S obzirom da smo od analiziranih biokemijskih parametara u skupini bolesnika na kliničkom početku MS utvrdili niže vrijednosti aktivnosti alkalne fosfataze u serumu i te vrijednosti korelirali smo s izražajem čimbenika osovine RANKL/RANK/OPG. Utvrdili smo umjerenu negativnu korelaciju plazmatske koncentracije čimbenika OPG ( $\rho=-0,470$ ,  $p=0,04$ ) i umjerenu pozitivnu korelaciju izražaja gena za RANKL u mononuklearima periferne krvi ( $\rho=0,389$ ,  $p=0,08$ ) sa serumskim vrijednostima aktivnosti alkalne fosfataze (Slika 25). To upućuje na bitnu povezanost aktivnosti osovine RANKL/RANK/OPG i aktivnosti alkalne fosfataze kao pokazatelja koštane izgradnje.



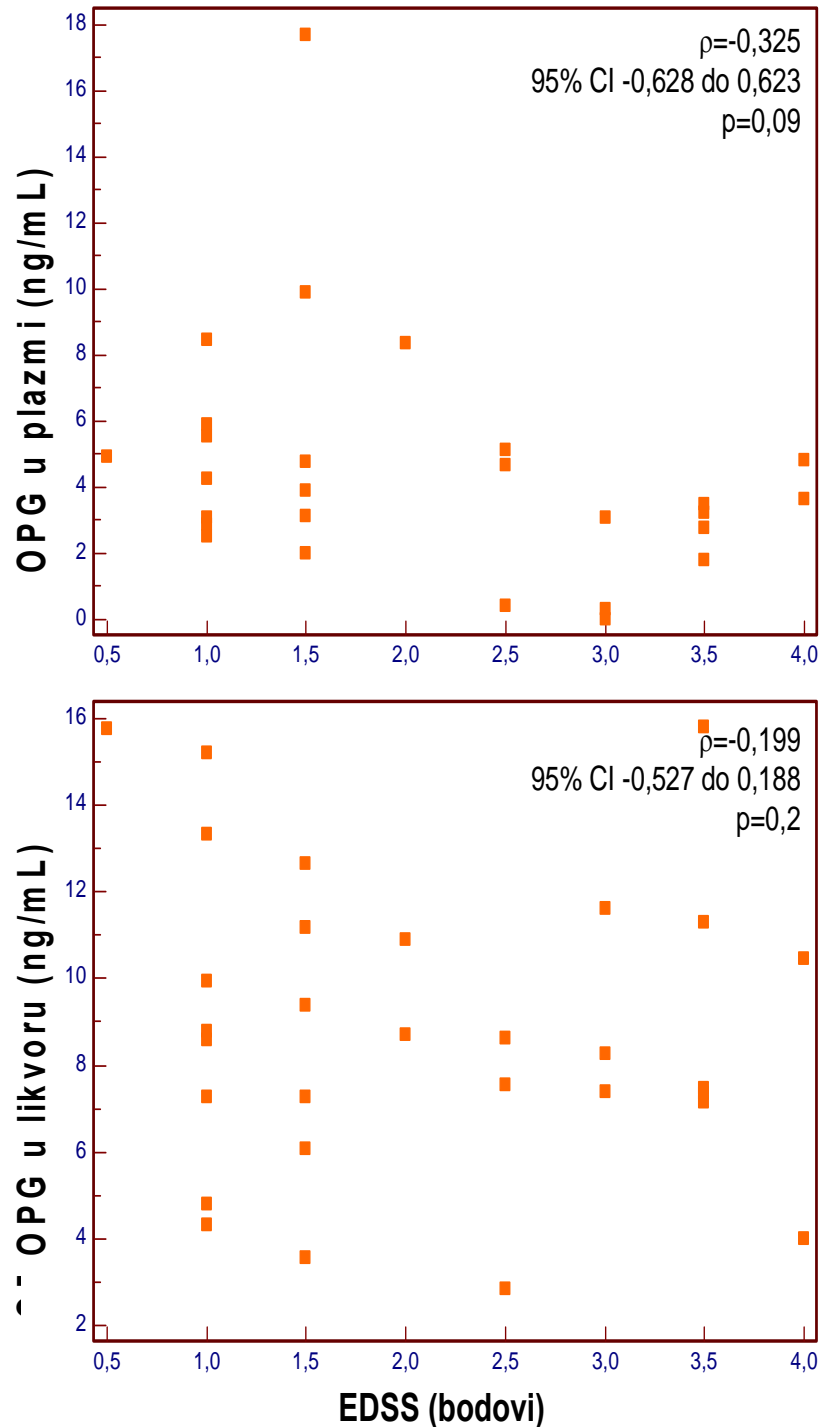
U zadnjem setu analiza testirali smo osjetljivost i specifičnost dobivenih vrijednosti izražaja gena i koncentracije čimbenika osovine RANKL/RANK/OPG te odabranih citokina i kemokina (za koje smo prethodno utvrdili razlike u izražaju između skupina, a to su IL-4, IL-10, CCL2 i CXCL12) u svrhu razlikovanja skupine kontrolnih ispitanika i bolesnika na kliničkom početku MS. Rezultati mjerenja testirani su ROC-krivuljama kojima se procjenjuje „dijagnostička učinkovitost“ razlika vrijednosti između kontrolne skupine i skupine bolesnika na temelju osjetljivosti i specifičnosti testa kod određene „prijelomne vrijednosti“. Od analiziranih čimbenika, najbolju sposobnost diskriminacije (razlikovanja) između skupine kontrolnih ispitanika i bolesnika na kliničkom početku MS imaju vrijednosti koncentracija čimbenika OPG u cerebrospinalnom likvoru ( $p=0,0001$ ), a umjerenu diskriminativnu sposobnost imaju vrijednosti izražaja gena za IL-10 ( $p=0,008$ ) i CCL2 ( $p=0,03$ ) u mononuklearnim stanicama periferne krvi (Slika 26).

Iz svih prikazanih rezultata zaključujemo da do poremećaja osovine RANKL/RANK/OPG tijekom razvoja MS dolazi najprije lokalno (intratekalno) na mjestu razvoja lezija i to posebice supresije čimbenika OPG čime se povećava biološka dostupnost čimbenika RANKL i njegovo vezanje za aktivacijski receptor RANK. Izražaj čimbenika te osovine poremećen je i prije nego se poremete vrijednosti klasičnih pokazatelja koštane razgradnje u serumu (koncentracija kalcija i fosfata). Nasuprot tome, aktivnost alkalne fosfataze povezana je s izražajem čimbenika RANKL i OPG te je umjereno snižena u bolesnika na kliničkom početku MS, što bi govorilo u prilog smanjene koštane izgradnje. S napredovanjem bolesti poremećaj izražaja čimbenika osovine RANKL/RANK/OPG uočljiv je na genskoj i proteinskoj razini i u plazmi bolesnika. Posebice je značajan povećan omjer topljivih čimbenika sRANKL/OPG i povećan izražaj aktivacijskog receptora RANK, što upućuje na pojačanu aktivnost te osovine i stimulaciju koštane razgradnje.

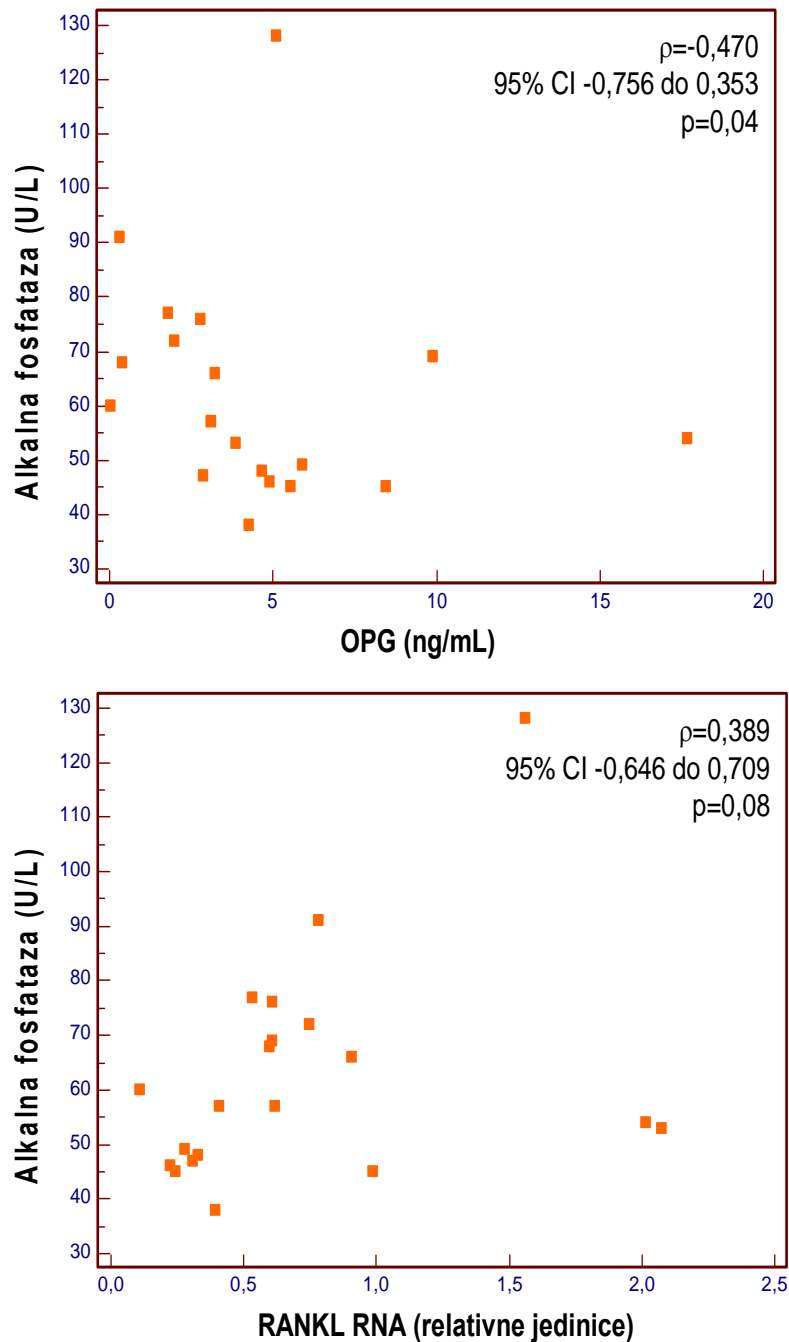
**Tablica 4. Laboratorijski parametri procjene koštanog metabolizma u plazmi bolesnika na kliničkom početku multiple skleroze**

<b>Značajka<sup>a</sup></b>	<b>Bolesnici na kliničkom početku MS</b>	<b>Referentne fiziološke vrijednosti</b>
<b>Fosfati, mmol/L</b>	1,05 (0,92-1,17)	0,79 – 1,42
<b>Kalcij, mmol/L</b>	2,43 (2,38 – 2,46)	2,14 – 2,53
<b>ALP, U/L</b>	57 (49 – 77) 57 (46 – 69)	Muškarci 60 – 142 Žene 50 – 153

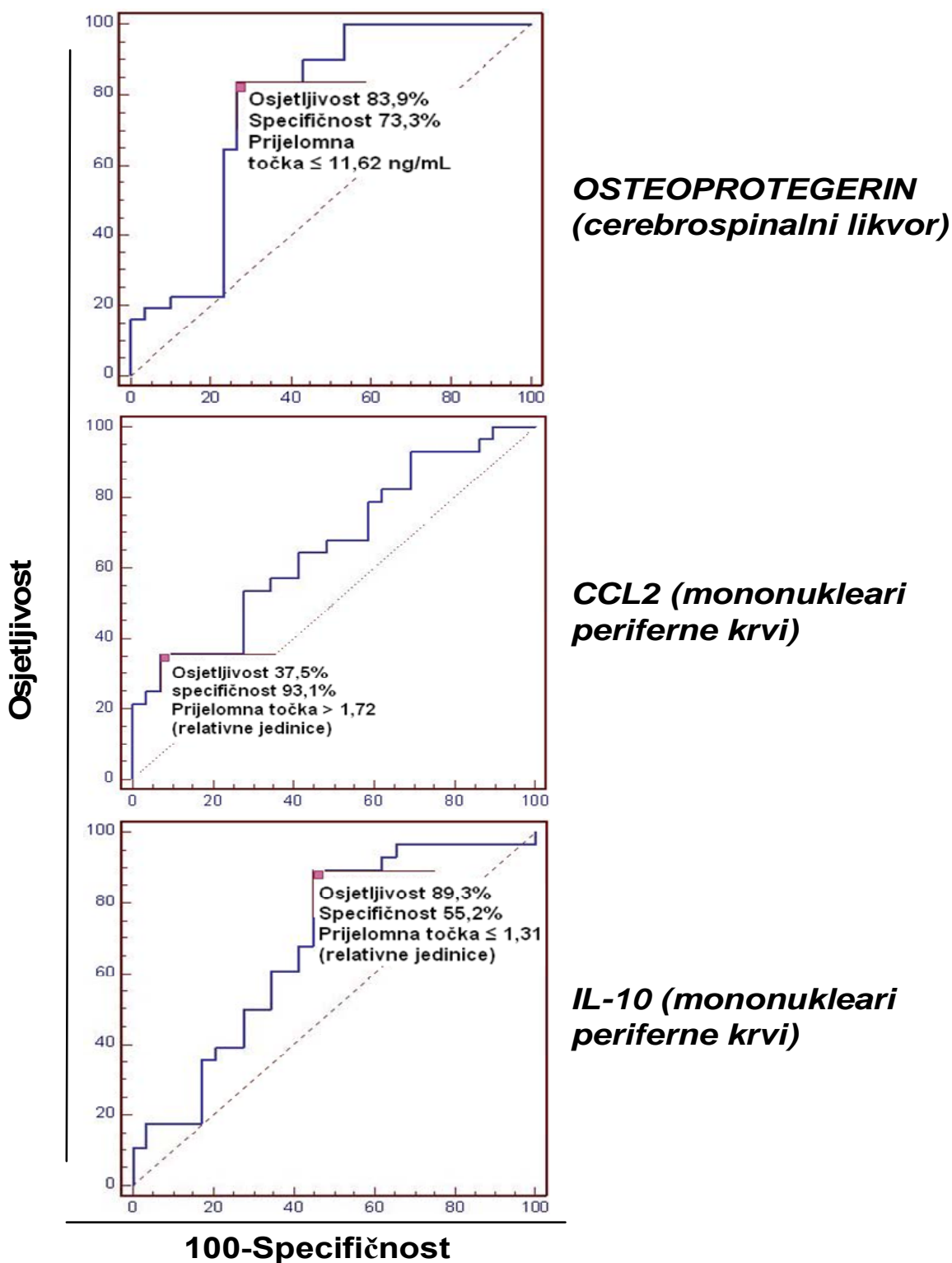
<sup>a</sup> Podaci su prikazani kao medijan (uz interkvartilni raspon). Korištene su referentne vrijednosti Dijagnostičkog laboratorija Kliničke bolnice „Dubrava“. MS, multipla skleroza; ALP, alkalna fosfataza.



**Slika 24. Korelacija EDSS sa razinama OPG u plazmi i likvoru bolesnika na kliničkom početku bolesti.** Razina proteina u plazmi određena je postupkom ELISA, te izražena koncentracijom ng/mL. EDSS označava kliničku ocjenu težine bolesti (u rasponu 0 do 10). Odgovarajuće vrijednosti, izmjerene u pojedinog kontrolnog ispitanika i bolesnika, statistički su analizirane testom korelacije ranga i prikazane Spearmanovim koeficijentom rho ( $\rho$ ) s 95%-tnim intervalom pouzdanosti (95% CI, prema engl. *confidence interval*). Za razinu statističke značajnosti postavljena je vrijednost  $p=0,05$ . OPG, osteoprotegerin; EDSS, prema engl. *expanded disability status scale*.



**Slika 25. Korelacija izražaja gena za čimbenik RANKL i koncentracije topljivog čimbenika OPG s koncentracijom alkalne fosfataze u uzorcima periferne krvi bolesnika koji boluju od multiple skleroze.** Izražaj gena analiziran je u mononuklearnim stanicama periferne krvi postupkom qPCR te izražen u obliku relativne količine RNA. Razina proteina u plazmi određena je postupkom ELISA te izražena koncentracijom ng/mL. Aktivnost ukupne alkalne fosfataze određena je u serumu kolorimetrijskim postupkom. Odgovarajuće vrijednosti, izmjerene u pojedinog kontrolnog ispitanika i bolesnika, statistički su analizirane testom korelacije ranga i prikazane Spearmanovim koeficijentom rho ( $\rho$ ) s 95%-tnim intervalom pouzdanosti (95% CI, prema engl. *confidence interval*). Za razinu statističke značajnosti postavljena je vrijednost  $p=0,05$ . RANKL, prema engl. *receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand*; OPG, osteoprotegerin.



Slika 26. Osjetljivost i specifičnost testiranja izražaja topljivog čimbenika OPG u cerebrospinalnom likvoru te kemokina CCL2 i citokina IL-10 u mononuklearima periferne krvi kontrolnih ispitanika i bolesnika na kliničkom početku multiple skleroze. Razlikovna sposobnost vrijednosti izražaja čimbenika OPG, CCL2 i IL-10 statistički je testirana ROC-krivuljama (prema engl. *receiver operating characteristic*). „Dijagnostičke učinkovitosti“ razlika tih vrijednosti između kontrolne skupine i skupine ispitanika koji boluju od multiple skleroze ocijenjena je na temelju osjetljivosti i specifičnosti testa kod određene „prijelomne vrijednosti“. Prikazana je statistička analiza ROC-krivulja za određenu prijelomnu točku, prikazani su rezultati za vrijednost  $p$  (za površinu ispod krivulje = 0.5)  $< 0.05$ .

## 6. RASPRAVA

U cilju testiranja hipoteze istraživanja, prema kojoj smo očekivali da u bolesnika na kliničkom početku MS postoji poremećen izražaj čimbenika RANKL/RANK/OPG, provedeno je nekoliko skupina pokusa kojima smo najprije utvrdili profil izražaja navedenih čimbenika na genskoj i proteinskoj razini, zatim razlike izražaja tih čimbenika u odnosu na kontrolne ispitanike i bolesnike s uznapređovalom RR-MS te na kraju njihovu povezanost s izražajem imunoregulacijskih molekula (citokina i kemokina) te kliničkom procjenom težine bolesti i osnovnim biokemijskim parametrima koštanog metabolizma.

Potvrdili smo postavljenu hipotezu, jer smo pokazali da već na kliničkom početku bolesti postoji snižena koncentracija čimbenika OPG, uz povišen omjer čimbenika sRANKL/OPG u cerebrospinalnom likvoru u odnosu na kontrolne ispitanike. Nadalje, u bolesnika s uznapređovalom RR-MS poremećaj čimbenika osovine RANKL/RANK/OPG prisutan je i u plazmi, čemu vjerojatno pridonose i drugi faktori koji remete koštani metabolizam, posebice liječenje kortikosteroidima i fizička neaktivnost. U sljedećim ćemo odjeljcima detaljno raspraviti dobivene rezultate u kontekstu njihovog znanstvenog doprinosa s obzirom na dosadašnje spoznaje te mogućeg kliničkog značenja u dijagnostičkim, prognostičkim i terapijskim protokolima. Kliničku važnost potvrđuje i činjenica da poremećaj osovine RANKL/RANK/OPG nalazimo u nekim upalnim i autoimunim bolestima, te da koncentracije čimbenika sRANKL i OPG mogu služiti kao biomarker bolesti. U tih je bolesti dokazan nepovoljan učinak aktivacije RANKL/RANK-signal, primjerice u RA gdje je dokazano da čimbenik RANKL, pojačano izražen u sinovijalnom tkivu, pridonosi razaranju zglobne hrskavice i koštanog tkiva (160). Čak i neovisno o koštanim učincima, visoke koncentracije solubilnog čimbenika sRANKL koreliraju s rizikom razvoja šećerne bolesti tipa II, dok je čimbenik OPG povezan s vaskularnom patologijom u aterosklerozi (161,162).

## **6.1. Poremećaj funkcije imunološkog sustava koji uzrokuje razvoj multiple skleroze pridonosi poremećaju osovine RANKL/RANK/OPG**

Pri određivanju profila molekula RANKL/RANK/OPG na proteinskoj i genskoj razini u perifernoj krvi i cerebrospinalnom likvoru fokusirali smo se na bolesnike na kliničkom početku MS. U tih bolesnika možemo testirati primarni poremećaj aktivnosti te osovine, koji pripisujemo osnovnom imunološkom poremećaju u MS, bez učinaka dodatnih čimbenika koji negativno djeluju na koštani metabolizam, primjerice liječenje kortikosteroidima i otežanu pokretljivost bolesnika s uznapredovalom bolešću. Također treba istaknuti da od svega nekoliko studija koje su istraživale ulogu čimbenika RANKL, RANK i OPG u MS, niti jedna nije uključivala bolesnike u početnoj fazi bolesti, uz usporednu analizu izražaja tih čimbenika u uzorcima periferne krvi i cerebrospinalnog likvora (81-83,147,163). U našu studiju uključili smo bolesnike na kliničkom početku bolesti u kojih je postavljena dijagnoza MS prema revidiranim kriterijima po McDonaldu (66). MS je kronična autoimuna upalna bolest središnjeg živčanog sustava, u čijoj patogenezi imunološki faktori imaju značajan doprinos jer imunološka reakcija, posebice djelovanjem brojnih proupalnih citokina, čini glavni mehanizam izazivanja demijelinizacijskog oštećenja (5). No, za razliku od nekih drugih autoimunih bolesti, primjerice RA, kronične upalne bolesti crijeva ili sistemskog lupusa, sustavni upalni markeri (SE, CRP, broj leukocita) najčešće nisu povišeni u cirkulaciji na kliničkom početku bolesti i tijekom faza remisije (164), kako smo potvrdili i u našoj skupini bolesnika. Bolest se razvija unutar središnjeg živčanog sustava, gdje citokini i kemokini potiču ekstrasvazaciju imunoloških stanica i njihovo naseljavanje na mjestima demijelinizacijskih plakova, a pridonose i oštećenju krvno-moždane barijere. Unutar demijelinizacijskih lezija posebice su u patogenezi važne subpopulacije limfocita Th1 i Th17, zbog proupalnog djelovanja i poticanja mononuklearne infiltracije (32,36). Aktivirane upalne stanice i limfociti luče proupalne i imunopoticajne citokine lokalno, ali i sustavno, posebice s

obzirom na povećanu propusnost krvno-moždane barijere s napredovanjem bolesti. Ti sustavno potaknuti upalni medijatori, primjerice IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, mogu negativno djelovati na koštanu pregradnju poticanjem diferencijacije i aktivnosti osteoklasta (85,114,141). Tako smo u perifernoj krvi bolesnika na kliničkom početku MS utvrdili pojačan izražaj proupalnog kemokina CCL2, ali i smanjen izražaj imunosupresivnog citokina IL-10, što bi govorilo u prilog oslabljenoj funkciji regulacijskih Tregs, uočenoj u MS (39).

Također smo utvrdili da se s napredovanjem bolesti dodatno pojačavaju proupalni učinci i stvaraju potentniji proresorptivni uvjeti. Tako bolesnici koji boluju od uznapredovale RR-MS, u odnosu na bolesnike na kliničkom početku MS, imaju znatnije povećan izražaj proupalnih kemokina CCL2 i CXCL12 te povećanu koncentraciju čimbenika sRANKL u perifernoj krvi. Osim toga, u bolesnika koji boluju od RR-MS postoje dodatni rizici koji pridonose gubitku koštane mase i opasnosti od patoloških fraktura. To uključuje fizičku neaktivnost, mišićnu slabost i poremećaj ravnoteže koji nastaju zbog neuroloških deficita, a uzrokuju gubitak poticajnog djelovanja mehanostimulacije na stvaranje kosti i sklonosti padovima (148). Uz to, kortikosteroidi koji se primjenjuju u liječenju bolesnika koji boluju od RR-MS tijekom relapsa bolesti, bez obzira na povoljan antiupalni učinak, pridonose gubitku kosti i razvoju osteoporoze i to izravnim djelovanjem na koštane stanice, ali i aktiviranjem osovine RANKL/RANK/OPG (165).



## **6.2. Profil čimbenika osovine RANKL/RANK/OPG promijenjen je u bolesnika koji boluju od multiple skleroze**

Osim brojnih proupalnih i imunopoticajnih citokin, važnih za diferencijaciju supopulacija limfocita koji sudjeluju u imunopatogenezi MS, i čimbenici osovine RANKL/RANK/OPG sudjeluju u regulaciji sazrijevanja imunoloških stanica i imunološkog odgovora. Sustav RANKL/RANK/OPG je otkriven i istražen istovremeno od strane nekoliko istraživačkih skupina koje su neovisno proučavale ključne čimbenike u kontekstu regulacije aktivnosti koštanih stanica, dok su se druge fokusirale na ulogu u imunološkom sustavu. Tako je dokazano da je osovina RANKL/RANK/OPG ključna za sazrijevanje osteoklasta, ali, također, i da RANKL izražen na limfocitima T pospješuje imunološki odgovor poticanjem preživljenja i funkcije dendritičnih stanica, ključnih za preradu i predočavanje antigena (131,166,167).

Čimbenik RANKL otkriven je neovisnim radom četiri istraživačke skupine te nazvan i TRANCE (prema engl. *TNF-related activation-induced cytokine*), ODF (prema engl. *osteoclast-differentiation factor*) i OPGL (prema engl. *osteoprotegerin ligand*) (131,166). Pripada TNF-superobitelji liganda i receptora, pa mu je prema TNF-nomenklaturi dodijeljen naziv TNFSF11 (prema engl. *TNF-superfamily 11*). Po strukturi pripada tipu II transmembranskog proteina i izrazito je homologan nekim drugim čimbenicima TNF-superobitelji, primjerice čimbenicima TRAIL (prema engl. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*), TNF- $\alpha$  i Fas-ligand. Osim membranske forme postoji i topljivi oblik molekule koji nastaje ili kodiranjem kraćom izoformom glasnike RNA (bez transmembranskog dijela) ili odcjepjivanjem membranske forme, posredovano djelovanjem enzima metaloproteaza-dezintegrina TACE (prema engl. *TNF- $\alpha$  convertase*). RANK, alternativno nazvan TRANCE-R (prema engl. *TRANCE receptor*) i ODAR (prema engl. *osteoclast differentiation and*

*activation receptor*), aktivacijski (signalni) je receptor za RANKL, prema TNF-nomenklaturi klasificiran kao TNFRSF11A (131,166). Osteoprotegerin, klasificiran kao TNFRSF11B, alternativno je nazvan OCIF (prema engl.*osteoclastogenesis inhibitory factor*) i FDCR-1 (prema engl. *follicular DC-derived receptor-1*), a primarno djeluje kao neutralizacijski (*decoy*) receptor, modulirajući interakciju liganda RANKL i aktivacijskog receptora RANK (131,166).

Aktivacija RANKL/RANK-signala unutar imunološkog sustava ključna je za razvoj i diferencijaciju epitelnog tkiva brojnih organa, uključujući limfne čvorove, mliječne žlijezde, medularne epitelne stanice timusa i folikularne epitelne stanice u limfnom tkivu crijeva. U odraslom organizmu, RANKL je izražen u različitim stanicama i tkivima uključujući limfocite T, osteoblaste, osteocite, stromu koštane srži i pluća, a njegov izražaj potiču različiti faktori važni u regulaciji koštanog metabolizma, uključujući glukokortikoide, vitamin D<sub>3</sub>, IL-1, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , Wnt-ligand i bakterijski lipopolisaharid (167). Glasnička RNA za aktivacijski receptor RANK detektirana je u timusu, jetri, crijevu, mliječnoj žlijezdi, prostati, gušterači, koštanoj srži, srcu, plućima, mozgu, skeletnim mišićima, bubregu, jetri i koži te, što je važno za koštani metabolizam, na osteoklastnim progenitorskim stanicama (131,166). Stvaranje neutralizacijskog receptora OPG prije svega je detektirano u stromalnim stanicama koštane srži, ali i u limfocitima B, dendritičnim stanicama i folikularnim dendritičnim stanicama nakon njihove aktivacije (131,166). Karakterizacija miševa s izbačenim genom za RANKL ili RANK pokazala je da ti miševi imaju poremećen razvoj sekundarnih limfnih tkiva, uključujući limfne čvorove, limfno tkivo pridruženo probavnom sustavu i slezenu (168). Interakcija između čimbenika RANKL i aktivacijskog receptora RANK regulira ključne funkcije dendritičnih stanica, uključujući apoptozu, aktivaciju i lučenje citokina koji potiču limfocite T (131,166).

Čimbenik RANKL predstavlja ključnu poveznicu funkcionalne interakcije između koštanog i imunološkog sustava, time što djeluje na regulacijske i progenitorske stanice oba sustava. Istraživanja unutarstaničnog signalnog puta pokrenutog vezanjem čimbenika RANKL na aktivacijski receptor RANK te regulacijskih mehanizama koji djeluju na prijenos toga signala dalje su naglasila njihovo preklapanje unutar koštanog i imunološkog sustava. Razjašnjavanje tih mehanizama i moguća terapijska aplikacija ključna je za brojne bolesti uključujući RA, periodontitis, osteoporozu, osteoartritis, multipli mijelom i koštane metastaze, koje su sve povezane s poremećajem koštanog metabolizma u smislu pojačanog koštanog razaranja (131,166). Primjerice, RA je autoimuna bolest karakterizirana upalom sinovijalnih zglobova te razaranjem zglobne hrskavice i subkondralne kosti (169,170). Brojne studije pokazale su da su sinovijalni fibroblasti primarni izvor čimbenika RANKL odgovornog za pojačanu diferencijaciju osteoklasta i osteoresorpciju. Pri tome, limfociti Th17 potiču izražaj čimbenika RANKL na sinovijalnim fibroblastima, lučenjem citokina IL-17, IL-1, TNF- $\alpha$  i IL-6 (170). Osim toga, limfociti Th17, posebice oni koji se diferenciraju iz regulacijskih limfocita Treg, izražavaju čimbenik RANKL kao odgovor na IL-6 kojeg luče sinovijalni fibroblasti te potiču aktivnost zrelih osteoklasta (171). Osim osteoresorptivnog djelovanja, poticanjem diferencijacije osteoklastnih progenitora i aktivnost zrelih osteoklasta, čimbenik RANKL regulira i imunološki odgovor. Primjerice u šećernoj bolesti tipa II aktivacija RANKL/RANK-signalnog puta potiče rezistenciju na inzulin u jetri (162). Nasuprot tome, čimbenik RANKL potiče perifernu imunotoleranciju i imunosupresiju stimulacijom diferencijacije regulacijskih limfocita Tregs u šećernoj bolesti tipa I (172). Iz prikazanog je jasno da razne autoimune bolesti mijenjaju aktivnost osovine RANKL/RANK/OPG te da ta osovina može djelovati i imunopoticažno i imunosupresijski ovisno o patološkom kontekstu i pridruženom mikrookolišu citokina, posebice IL-1, IL-6, IL-17, IL-23, TNF- $\alpha$  i TGF- $\beta$  (169,170).

S obzirom da je poremećeni imunološki odgovor ključan u patogenezi MS, pretpostavili smo da, uz ostale promjene, može uključivati i poremećen izražaj čimbenika RANKL, RANK i OPG. Nadalje, u skladu s kompleksnom ulogom osovine RANKL/RANK/OPG u imunološkom i u koštanom sustavu, taj poremećaj bi s jedne strane mogao pridonositi patogenezi demijelinizacijske bolesti a s druge strane remetiti koštani metabolizam, slično drugim navedenim autoimunim bolestima. Od čimbenika osovine RANKL/RANK/OPG u bolesnika na kliničkom početku MS uključenih u naše istraživanje najuočljivija je snižena likvorska koncentracija neutralizacijskog receptora OPG, uz povećan omjer čimbenika sRANKL/OPG, što bi govorilo u prilog pojačane aktivnosti te osovine unutar intratekalnog prostora. Značajno veći omjer topljivih čimbenika sRANKL i OPG nalazimo i u plazmi bolesnika ali samo onih s uznapredovalom RR-MS, a ne na kliničkom početku bolesti. To upućuje na zaključak da se poremećaj aktivnosti osovine RANKL/RANK/OPG razvija najprije unutar središnjeg živčanog sustava, a s napredovanjem bolesti može se detektirati i sustavno. Treba još naglasiti da su likvorske koncentracije čimbenika sRANKL i OPG više od odgovarajućih koncentracija u plazmi, posebice za OPG, što također potvrđuje da se ti čimbenici proizvode lokalno unutar središnjeg živčanog sustava i u skladu je s prethodnim istraživanjima (82,83,147,163). Studija Hofbauera i suradnika detektirala je OPG na proteinskoj razini u cerebrospinalnom likvoru ispitanika koji boluju od neupalnih neuroloških bolesti, u rasponu koncentracija sličnoj vrijednostima koje smo izmjerili u našoj studiji (od 0,8 do 21,9 ng/mL) (83). U *post-mortem* uzorcima različitih dijelova središnjeg živčanog sustava, mRNA za OPG specifično je utvrđena u kralježničnoj moždini, odakle se OPG vjerojatno otpušta u cerebrospinalnom likvoru. Međutim, nije utvrđena značajna razlika u koncentraciji čimbenika OPG između neupalnih bolesti središnjeg živčanog sustava i MS niti povezanost s proteinskim sadržajem u cerebrospinalnom likvoru i leukocitnim populacijama. S druge strane, čimbenik RANKL nije detektiran unutar središnjeg

živčanog sustava niti na proteinskoj razini niti na razini izražaja gena, premda je navedena studija koristila proteinski set ELISA istog proizvođača kao i naša studija (*high sensitivity ELISA assay*, Biomedica). U niskim koncentracijama (od 0,2 do 1,3 ng/mL) sRANKL smo detektirali u svim kontrolnim uzorcima i uzorcima bolesnika na kliničkom početku MS, što pripisujemo mogućoj boljoj pripremi uzoraka i većoj osjetljivosti novijeg seta ELISA, ali bez značajne razlike između skupina. Iz navedenog zaključujemo da čimbenik OPG pridonosi homeostazi unutar središnjeg živčanog sustava od čimbenika RANKL, u skladu s istraživanjima koja su pokazala da OPG može imati lokalni anti-apoptotični čimbenik u benignim i malignim bolestima središnjeg živčanog sustava (83,173).

Nasuprot nepromijenjenoj koncentraciji čimbenika sRANKL u cerebrospinalnom likvoru, u serumu nalazimo povišene koncentracije toga čimbenika posebice u bolesnika s uznapredovalom MS. Također, postoji značajna povezanost izražaja gena za RANKL u mononuklearnim stanicama periferne krvi i solubilnog oblika molekule, što bi govorilo u prilog zaključku da su imunološke stanice barem dijelom izvor toga čimbenika u cirkulaciji te da koncentracija solubilne molekula dobro odražava ukupnu količinu toga čimbenika (167). Alatab i suradnici također su istraživali serumske koncentracije čimbenika RANKL zajedno s drugim proupalnim molekulama (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i CRP) u kontrolnih ispitanika i nekoliko kliničkih formi MS (163). Slično našim rezultatima, utvrdili su značajno višu koncentraciju čimbenika RANKL u bolesnika koji boluju od MS, posebice u podskupini bolesnika koji boluju od najagresivnijeg oblika PP-MS. U nastavku istraživanja ista skupina autora pokazala je da je koncentracija čimbenika OPG viša, a čimbenika RANKL niža u bolesnika koji boluju od RR-MS u odnosu na bolesnike koji boluju od SP-RS (82), iz čega je zaključeno da osovina RANKL/RANK/OPG sudjeluje u patogenezi i progresiji MS.

Osim same progresije bolesti, na profil izražaja čimbenika RANKL i OPG mogu djelovati i lijekovi koji se daju bolesnicima koji boluju od MS, primjerice IFN- $\beta$  i

glukokortikoidi. Weinstock-Guttman i suradnici istraživali su učinak intramuskularne aplikacije IFN- $\beta$ 1a (30  $\mu$ g) u bolesnika koji boluju od RR-MS na dinamiku izražaja čimbenika RANKL i OPG u perifernoj krvi (147). Utvrdili su da IFN- $\beta$  neposredno nakon primjene (8 sati) smanjuje izražaj čimbenika OPG a povećava izražaj čimbenika RANKL, dok u nastavku praćenja dolazi do pojačanog izražaja čimbenika OPG. Uz to, IFN- $\beta$  dodan u osteoklastogenetske kulture *ex vivo*, u kojima su mononuklearne stanice priferne krvi potaknute čimbenicima RANKL i M-CSF, značajno smanjuje broj diferenciranih osteoklasta (147). Osim IFN- $\beta$ , tijekom relapsa bolesnici koji boluju od MS liječe se kratkotrajno visokim dozama metilprednizolona (5). Čak i nakon kratkoročne primjene, suprafizioloških doza glukokortikoidi uzrokuju brzo i značajno smanjenje kvalitete koštanog tkiva, što uključuje koštani matriks, mikroarhitekturu kosti, intenzitet koštane pregradnje te otpornost na mehaničke testove te predstavljaju glavni uzrok razvoja sekundarne osteoporoze (165). Istraživanju Dovia i suradnika, koje je uključivalo mlađe bolesnike koji boluju od MS u fazi relapsa, normalno pokretne i bez dodatnih bolesti koje djeluju na koštani metabolizam, potvrdilo je da visoke doze glukokortikoida i nakon kratkotrajne primjene uzrokuju smanjeno stvaranje kosti, uz poticanje koštane razgranje (152). Taj je učinak prije svega posljedica izravnog djelovanja glukokortikoida na koštane stanice, uključujući kočenje diferencijacije, preživljenja i funkcije osteoblasta (sinteze matriksnih proteina, čimbenika rasta i citokina) te poticanje preživljenja i aktivnosti osteoklasta (165,166). U tom negativnom učinku na koštani metabolizam značajno je djelovanje glukokortikoida na aktivnost osovine RANKL/RANK/OPG, i to poticanjem izražaja čimbenika RANKL te smanjenjem izražaja neutralizacijskog receptora OPG (166,174).

Osim značajno veće koncentracije čimbenika sRANKL, bolesnici s uznapredovalom RR-MS imaju i povećan izražaj gena za RANK u mononuklearnim stanicama periferne krvi. Pokretanje RANK-signala u osteoklastnim progenitorim ključno je za diferencijaciju

osteoklastnih progenitora u zrele funkcionalne osteoklaste (131). Proupalni citokini, primjerice TNF- $\alpha$  i IL-17, potiču izražaj receptora RANK na osteoklastnim progenitorskim stanicama u RA (175). Aktivacija RANKL/RANK-signala istraživana je i u zloćudnim tumorima koji primarno ili sekundarno zahvaćaju koštano tkivo (166). Pri tome pojačanje RANK-signala uzrokuje prekomjernu diferencijaciju i aktivnost osteoklasta, što vodi stvaranju osteolitičkih žarišta primjerice u multiplom mijelomu. Osim toga u nekim je tumorima, primjerice raku dojke i melanomu, pokazano da stimulacija RANKL/RANK-signala potiče i razvoj primarnog tumora i razvoj metastaza (166,176).

Profil čimbenika RANKL, RANK i OPG u bolesnika koji boluju od MS utvrđen u našoj studiji, posebice povećan omjer čimbenika sRANKL/OPG i pojačan izražaj aktivacijskog receptora RANK, pokazuje da oni imaju povećan osteoresorptivni potencijal te veću sklonost razvoju osteoporoze. Na taj primarni poremećaj osovine RANK/RANKL/OPG u bolesnika na kliničkom početku MS nadovezuje se učinak primijenjene imunosupresivne i imunomodulacijske terapije te smanjena pokretljivosti s progresijom bolesti (150-154). Meta-analiza koju su proveli Huang i suradnici pokazala je da bolesnici koji boluju od MS imaju smanjenu koštanu gustoću u usporedbi sa zdravim ispitanicima te da trajanje bolesti, ukupna doza primijenjenih glukokortikoida i bodovanje prema EDSS-ljestvici predstavljaju čimbenike rizika manje koštane gustoće i razvoja osteoporoze. Međutim, primijenjena analiza nije razjasnila uzroke heterogenosti kliničkih značajki bolesnika vezano za koštane parametre (149). Naše istraživanje pridonosi razjašnjenju promjena koštanog metabolizma u bolesnika koji boluju od MS, jer naglašava važnost primarnog poremećaja aktivnosti osovine RANKL/RANK/OPG, što te bolesnike čini podložnijim djelovanju sekundarnih pro-resorptivnih čimbenika koji dalje pogoduju poremećaju koštanog metabolizma i gubitku koštane mase.

### **6.3. Odnos proupalnih i imunosupresivnih citokina promijenjen je u bolesnika koji boluju od multiple skleroze**

Stanični i molekularni mehanizmi koji uzrokuju razvoj autoimune upalne reakcije u MS te regulacijski mehanizmi koji koče izbijanje i progresiju upalnog odgovora unutar središnjeg živčanog sustava još uvijek nisu potpuno razjašnjeni. Stoga su istraživanja koja povezuju promjene perifernog imunološkog odgovora i imunološke reakcije unutar središnjeg živčanog sustava ključna za razumijevanje imunopatogeneze bolesti. Također, takva istraživanja omogućuju procjenu relevantnosti rezultata dobivenih analizom periferne krvi u odnosu na analizu cerebrospinalnog likvora i samih lezija unutar središnjeg živčanog sustava (koja su razmjerno malobrojna poglavito zbog nedostupnosti lokalnih uzoraka) (83). Stoga smo u našem istraživanju analizirali profil izražaja proupalnih i imunosupresivnih citokina i kemokina u mononuklearima periferne krvi bolesnika koji boluju od MS, a za odabrane medijatore odredili smo i proteinsku razinu u serumu i cerebrospinalnom likvoru.

Razvoju upalne reakcije pridonose aktivirane stanice vaskularnog endotela krvno-moždane barijere te stanice mikroglije koje lokalno luče proupalne citokine i kemokine te uzrokuju ekstravazacije leukocita i njihovog naseljavanja na mjestima demijelinizacijskih plakova. Te privučene imunološke stanice dalje pridonose stvaranju lokalnog proupalnog mikrookoliša što posljedično oštećuje mijelinski omotač, a kasnije i aksone neurona. Progresijom bolesti i daljnjim oštećenjem krvno-moždane barijere te aktivirane imunološke stanice zastupljene su i u cirkulaciji te, prema rezultatima brojnih studija, njihova analiza omogućuje procjenu aktivnosti MS (5,10,43,44). Međutim, u našem istraživanju nismo potvrdili pojačan izražaj citokina IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i IL-17 u mononuklearnim stanicama periferne krvi u bolesnika na kliničkom početku MS. Naprotiv, bolesnici koji boluju od RR-MS imali su smanjen izražaj TNF- $\alpha$  tijekom remisije, što se vjerojatno može pripisati primjeni IFN- $\beta$  (177). Nasuprot našim rezultatima, Alatab i suradnici utvrdili su povišene



koncentracije citokina TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i RANKL, zajedno s povišenim vrijednostima upalnog biljega CRP. Također su pokazali i inverznu povezanost koncentracija citokina TNF- $\alpha$  i RANKL s izražajem transkripcijskog čimbenika Foxp3, koji je biljeg subpopulacije limfocita Tregs. Međutim, razlike su bile značajne samo za skupinu bolesnika s kliničkim oblikom PP-MS, što bi upućivalo na zaključak da je upalni fenotip naglašeniji u agresivnijim i aktivnijim formama bolesti (163). Nasuprot očekivanju, u cerebrospinalnom smo likvoru utvrdili snižene koncentracije proupalnih citokina TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , što bi moglo predstavljati prilagodbu upalnog procesa tijekom kroničnog upalnog procesa u MS (154). S druge strane, navedeni bi citokini mogli biti vezani za receptore na ciljnim stanicama (stanice vaskulanog endotela, stanice mikroglije, limfocite T) unutar ili oko patoloških lezija pa je stoga njihova koncentracija molekula u cerebrospinalnom likvoru snižena. Napominjemo i da su izmjerene koncentracije navedenih citokina vrlo niske (do 2,5 ng/mL) te nisu detektirane u svim analiziranim uzorcima, slično kao u istraživanjima Rossi i suradnika (178,179). Među skupinom bolesnika s kliničkim oblikom RR-MS mjerljiva koncentracija IL-1 $\beta$  utvrđena je u manje od pola analiziranih uzoraka cerebrospinalnog likvora (178). Detekcija IL-1 $\beta$  u vrijeme remisije nije bila povezana s ranijim relapsom ili razvojem lezija na magnetskoj rezonanci. Međutim perzistiranje proupalnog mikrookoliša u RR-MS tijekom kliničke i radiološke remisije ipak je predstavljalo negativni prognostički faktor zbog povezanosti s indeksom progresije i bodovanjem MSSS (prema engl. *Multiple Sclerosis Severity Scale*) tijekom praćenja bolesnika. Ista skupina autora potvrdila je povišene koncentracije citokina TNF- $\alpha$  u bolesnika s progresivnim formama MS, koji može djelovati kao primarna neurotoksična molekula i uzorokovati ekscitotoksičnu smrt neurona in vitro (179). Studija koja je analizirala brojne proupalne citokine (uključujući IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-12, IL-17, TNF- $\alpha$ ) u upalnim i infektivnim bolesti središnjeg živčanog sustava pokazala je da je čak i u bakterijskih

meningitisa TNF- $\alpha$  poglavito detektiran u perifernoj krvi, a ne cerebrospinalnom likvoru bolesnika (180).

Unatoč nezamjetnim razlikama u izražaju klasičnih proupalnih citokina (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i IL-17), proupalni fenotip u serumu bolesnika koji boluju od MS povrdili smo detektiranjem jačeg izražaja proupalnih kemokina CCL2 i CXCL12. Kemokinski gradijent ključan je za migraciju upalnih stanica i limfocita na mjesta demijelinizacijskih lezija te razjašnjavanje tih mehanizama kemotaksije ima značajan terapijski potencijal (181). I u aktivnim i u neaktivnim lezijama detektiran je izražaj kemokina CXCL12 (nazvanog i SDF-1, prema engl. *stromal cell-derived factor 1*), poglavito na astrocitima i endotelu krvnih žila, što potvrđuje njegovu ulogu u ektravazaciji leukocita, a može pridonositi i oštećenju aksona (155). CCL2 (nazvan i MCP-1, prema engl. *monocyte chemoattractant protein 1*) jedan je od ključnih kemokina koji kontrolira migraciju i infiltraciju monocita/makrofaga, a uključen je u patogenezu brojnih neurodegenerativnih bolesti središnjeg živčanog sustava uključujući Alzheimerovu bolest, MS i ishemijsko oštećenje mozga (182). Posebice je za patogenezu MS značajno da oba kemokina djeluju kemotaksijski na subpopulaciju limfocita Th17, koja uz IL-17 luči i citokin IFN- $\gamma$  (nazvana subpopulacija Th17-1), a izražava odgovarajuće kemokinske receptore (CCR2 i CXCR3). Limfociti Th17-1 pojačano se diferenciraju u krvi te prelaze krvno-moždanu barijeru i akumuliraju se u moždanom tkivu tijekom relapse MS (181). Proupalni mirookoliš bolesnika koji boluju od MS dodatno je potenciran pojačanim izražajem IL-4, koji predstavlja Th2-citokin te potiče limfocite B i lučenje protutijela te smanjenim izražajem IL-10, kojeg poglavito luče limfociti Tregs i čini važan homeostatski mehanizam negativne povratne sprege djelovanja proupalnih citokina (21-23).

#### **6.4. Aktivnost osovine RANKL/RANK/OPG povezana je s citokinskim/kemokinskim profilom i kliničkim parametrima bolesti**

Brojni čimbenici povećavaju rizik smanjenja koštane mase i razvoja ostoporoze u MS, a poglavito se odnose na liječenje glukokortikoidima i otežanu pokretljivost (149-152). No uz te sekundarne čimbenike, naša je pretpostavka da postoji i primarni poremećaj aktivnosti osovine RANKL/RANK/OPG, koja predstavlja ključni molekularni modulator koštane homeostaze (85,91,108). Analizom povezanosti izražaja čimbenika te osovine i kliničke procjene težine bolesti utvrđena je inverzna povezanost serumske i likvorske koncentracije neutralizacijskog receptora OPG sa stupnjem kliničke aktivnosti MS prikazane EDSS-bodovanjem. Također smo utvrdili negativnu korelaciju serumske koncentracije neutralizacijskog receptora OPG te pozitivnu korelaciju izražaja gena za RANKL u mononuklearima periferne krvi sa serumskim vrijednostima aktivnosti alkalne fosfataze, kao pokazatelja koštane izgradnje. Osim navedenih kliničkih i koštanih parametara, i izražaj citokina (IL-4, IL-10) i kemokina (CCL2, CXCL12) bio je značajno povezan s izražajem čimbenika osovine RANKL/RANK/OPG. Weinstock-Guttman i suradnici također su analizirali izražaj čimbenika RANKL i OPG usporedno s parametrima koštanog metabolizma, i to tijekom primjene IFN- $\beta$  u bolesnika koji boluju od RR-MS (147). Utvrdili su da tretman modulira izražaj čimbenika RANKL i OPG te da je koncentracija osteokalcina (biljega koštane izgradnje) snižena u bolesnika, a povećava se nakon primjene IFN- $\beta$ . Također je u uzorcima periferne krvi uočen pojačan izražaj kemokina CCL4 (nazvanog i MIP-1 $\beta$ , prema engl. *macrophage inflammatory protein 1 $\beta$* ), koji potiče osteolizu (147).

Iz svega prikazanog možemo sažeti da na kliničkom početku MS dolazi do poremećaja osovine RANKL/RANK/OPG, vjerojatno u sklopu primarnog autimunog procesa. Pretpostavljamo da do poremećaja osovine RANKL/RANK/OPG tijekom razvoja MS dolazi najprije lokalno (intratekalno) na mjestu razvoja lezija, i to posebice supresije čimbenika OPG

čime se povećava biološka dostupnost čimbenika RANKL. Aktivnost alkalne fosfataze povezana je s izražajem čimbenika RANKL i OPG te je umjereno snižena u bolesnika na kliničkom početku MS, što bi govorilo u prilog smanjene koštane izgradnje. S napredovanjem bolesti pojačava se aktivnost te osovine na genskoj i proteinskoj razini i u plazmi bolesnika, a posebice je značajan povećan omjer topljivih čimbenika sRANKL/OPG i povećan izražaj aktivacijskog receptora RANK, što upućuje na povećan osteoresorpciju. I u drugim autoimunim bolestima patogenetska podloga uključuje poremećene funkcionalne interakcije imunološkog i koštanog sustava, a taj poremećaj često je uzrokovan promjenama aktivnosti osovine RANKL/RANK/OPG. Izvor čimbenika RANKL i mjesto razvoja poremećaja ključno je u određivanju hoće li poremećaj aktivnosti osovine primarno zahvatiti imunološki ili koštani sustav, a s razvojem u većini bolesti na kraju zahvaća oba sustava. Pri tome neutralizacijski receptori OPG može predstavljati važan homeostatski krak osovine, dokazan i unutar središnjeg živčanog sustava. Prema rezultatima naše studije, likvorske koncentracije čimbenika OPG imaju diskriminativnu vrijednost između kontrolnih uzoraka i uzoraka na kliničkom početku MS, dok se s progresijom bolesti značajno povećava plazmatska koncentracija čimbenika RANKL, što bi imalo klinički značaj u smislu njihove uloge kao biomarkera razvoja i progresije bolesti.

Daljnje istraživanja potrebna su da bi se razjasnila uloga tih čimbenika u upalnim i degenerativnim bolestima središnjeg živčanog sustava. S obzirom da čimbenici osovine RANKL/RANK/OPG sudjeluje u patogenezi i progresiji MS, mogli bi predstavljati potencijalni cilj novijih terapijskih postupaka, tim više što je biološka terapija koja uključuje blokiranje djelovanja čimbenika RANKL i onemogućava pokretanje RANKL/RANK-signalnog puta u fazi kliničkog ispitivanja ili se već primjenjuje za liječenje nekih upalnih i koštanih bolesti (183-187).

## 7. ZAKLJUČCI

1. Na kliničkom početku MS uz stvaranje proupalnog fenotipa dolazi i do poremećaja aktivnosti čimbenika osovine RANKL/RANK/OPG, vjerojatno u sklopu primarnog autiomunog procesa.
2. Aktivnost osovine na početku bolesti promijenjena je lokalno (intratekalno) u smislu snižene likvorske koncentracije neutralizacijskog receptora OPG, čime se povećava biološka dostupnost čimbenika RANKL.
3. U uznapredovaloj bolesti povećan je omjer sRANKL/OPG i izražaj aktivacijskog receptora RANK u stanicama periferne krvi, što upućuje na pojačanu sustavnu aktivnost osovine i povećan proresorptivni potencijal.
4. U bolesnika koji boluju od MS pojačan je izražaj proupalnih kemokina CCL2 i CXCL12, uz slabiji izražaj imunosupresivnog citokina IL-10, što potiče migraciju imunoloških stanica i upalni odgovor.
5. Profil čimbenika osovine RANKL/RANK/OPG povezan je s izražajem citokina IL-4 i IL-10 te kemokina CCL2 i CXCL12 u limfocitima periferne krvi, upućujući na zajedničke regulacijske mehanizme tih medijatora.

6. Izražaj neutralizacijskog receptora OPG, koji koči aktivnost RANKL/RANK-signalu, negativno korelira s procjenom težine bolesti EDSS-ljestvicom, što znači da je taj osteoprotektivni čimbenik slabije izražen u aktivnijoj bolesti.
7. Bolesnici na kliničkom početku MS uključeni u istraživanje prema EDSS-bodovanju imaju umjerene neurološke ispade uz normalnu pokretljivost, ali ih oko polovice ima snižene vrijednosti aktivnosti serumske alkalne fosfataze.
8. Izražaj osteoresorptivnog čimbenika RANKL pozitivno korelira, a neutralizacijskog receptora OPG negativno korelira s aktivnošću alkalne fosfataze u serumu, što može upućivati na povezanost aktivnosti osovine i koštane izgradnje.
9. Likvorske koncentracije čimbenika OPG te izražaj gena za IL-10 i CCL2 u mononuklearima periferene krvi omogućuju razlikovanje uzoraka na kliničkom početku MS od kontrolnih uzoraka te mogu služiti kao biomarkeri bolesti.
10. S obzirom da čimbenici osovine RANKL/RANK/OPG sudjeluju u patogenezi i progresiji MS, mogli bi predstavljati potencijalni cilj novijih terapijskih postupaka u smislu primjene biološke terapije koja koči RANKL/RANK-signalni put.

## 8. SAŽETAK

Multipla skleroza (MS, prema engl. *multiple sclerosis*) je autoimuna upalna bolest središnjeg živčanog sustava u čijoj patogenezi imunološki faktori čine glavni mehanizam demijelinizacijskog oštećenja. Također, bolesnici koji boluju od MS imaju poremećenu koštanu pregradnju, što se najčešće pripisuje primjeni glukokortikoida i smanjenoj pokretljivosti. Hipoteza ovoga istraživanja je da u bolesnika koji boluju od MS, osim tih sekundarnih čimbenika osteoporoze, postoji pojačano djelovanje RANKL (prema engl. *receptor-activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand*)/RANK-signala u sklopu primarnog autoimunog poremećaja. Stoga smo analizirali parametre koštane pregradnje i upale u perifernoj krvi i cerebrospinalnom likvoru u MS na kliničkom početku bolesti u odnosu na profil osteoresorptivne RANKL/RANK-osovine. Na početku bolesti snižena je likvorska koncentracija neutralizacijskog receptora OPG (prema engl. *osteoprotegerin*), čime se povećava biološka dostupnost čimbenika RANKL. U uznapredovaloj bolesti povećan je omjer RANKL/OPG i izražaj aktivacijskog RANK-receptora u krvi, što odražava povećan proresorptivni potencijal. Profil čimbenika osovine RANKL/RANK/OPG povezan je s izražajem imunosupresivnih citokina IL-4 i IL-10 te proupalnih kemokina CCL2 i CXCL12. Izražaj osteoresorptivnog čimbenika RANKL pozitivno korelira, a neutralizacijskog receptora OPG negativno korelira s težinom bolesti i aktivnošću alkalne fosfataze, što može upućivati na povezanost aktivnosti osovine, intenziteta bolesti i koštane izgradnje. S obzirom da osovina RANKL/RANK/OPG sudjeluje u patogenezi i progresiji MS, ti čimbenici mogli bi služiti kao biomarkeri bolesti i ciljne molekule novijih terapijskih postupaka.

## 9. SUMMARY

### **Disturbed expression of the osteoresorptive cytokine RANKL in patients with multiple sclerosis at clinical onset**

Anton Glasnović

Zagreb, 2015.

Multiple sclerosis (MS) is autoimmune inflammatory disease of the central nervous system in which immunological factors play the crucial role of demyelinating damage. Also, patients with MS have deregulated bone remodelling, mainly caused by glucocorticoid treatment and reduced mobility. We hypothesized that, beside these secondary osteoporotic factors, MS patients have enhanced RANKL (receptor-activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand)/RANK-signal as a part of underlying autoimmune disturbance. Therefore we analyzed the parameters of bone remodeling and inflammation in peripheral blood and cerebrospinal fluid in MS patients at clinical onset in relation to osteoresorptive RANKL/RANK-axis. At MS clinical onset concentrations of decoy receptor OPG (osteoprotegerin) are decreased in cerebrospinal fluid, increasing the bioavailability of RANKL. Advanced MS is marked by higher RANKL/OPG ratio and activating RANK-receptor expression in peripheral blood, which suggests increased proresorptive potential. RANKL/RANK/OPG profile is associated with the expression of immunosuppressive cytokines IL-4 and IL-10 and proinflammatory chemokines CCL2 and CXCL12. Osteoresorptive factor RANKL is in positive, and decoy receptor OPG is in negative correlation with disease severity and alkaline phosphatase activity, interconnecting axis activity, disease intensity and bone formation. Since RANKL/RANK/OPG axis is involved in pathogenesis and progression of MS, these factors may serve as disease biomarkers and molecular targets of novel therapeutic approaches.



## 10. LITERATURA

1. Ben-Nun A, Cohen IR. Vaccination against autoimmune encephalomyelitis (EAE): attenuated autoimmune T lymphocytes confer resistance to induction of active EAE but not to EAE mediated by the intact T lymphocyte line. *Eur J Immunol*. 1981 Nov;11(11):949-52.
2. Calabresi L, Villa B, Canavesi M, Sirtori CR, James RW, Bernini F, Franceschini G. An omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrate increases plasma high-density lipoprotein 2 cholesterol and paraoxonase levels in patients with familial combined hyperlipidemia. *Metabolism*. 2004 Feb;53(2):153-8.
3. Hauser SL. Multiple lessons for multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2008 Oct 23;359(17):1838-41.
4. Rodriguez M, Siva A, Ward J, Stolp-Smith K, O'Brien P, Kurland L. Impairment, disability, and handicap in multiple sclerosis: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Neurology*. 1994 Jan;44(1):28-33.
5. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2008 Oct 25;372(9648):1502-17.
6. Marrie RA. Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurol*. 2004 Dec;3(12):709-18.
7. Alvord EC, Mgee KR, Kies MW, Goldstein NP. Clinico-pathologic correlations in experimental allergic encephalomyelitis. Observation on the early lesion. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1959 Jul;18(3):442-6.
8. Waksman BH, Porter H, Lees MD, Adams RD, Folch J. A study of the chemical nature of components of bovine white matter effective in producing allergic encephalomyelitis in the rabbit. *J Exp Med*. 1954 Nov 1;100(5):451-71.

9. Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*. 2006 Aug;129(Pt 8):1953-71.
10. Brinar V. Neurologija za medicinare. Medicinska naklada; 2009. str. 302-323.
11. Brück W. The pathology of multiple sclerosis is the result of focal inflammatory demyelination with axonal damage. *J Neurol*. 2005 Nov;252 Suppl 5:v3-9.
12. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, Schmidbauer M, Parisi JE, Lassmann H. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain*. 2005 Nov;128(Pt 11):2705-12.
13. Beck J, Rondot P, Catinot L, Falcoff E, Kirchner H, Wietzerbin J. Increased production of interferon gamma and tumor necrosis factor precedes clinical manifestation in multiple sclerosis: do cytokines trigger off exacerbations? *Acta Neurol Scand*. 1988 Oct;78(4):318-23.
14. Navikas V, Link H. Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurosci Res*. 1996 Aug 15;45(4):322-33.
15. Traugott U, Lebon P. Multiple sclerosis: involvement of interferons in lesion pathogenesis. *Ann Neurol*. 1988 Aug;24(2):243-51.
16. Panitch HS, Hirsch RL, Schindler J, Johnson KP. Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology*. 1987 Jul;37(7):1097-102.
17. Miceli MC, Parnes JR. Role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation. *Adv Immunol*. 1993;53:59-122.
18. Zhang X, Tang Y, Sujikowska D, Wang J, Ramgolam V, Sospedra M, Adams J, Martin R, Pinilla C, Markovic-Plese S. Degenerate TCR recognition and dual DR2 restriction of autoreactive T cells;

implications for the initiation of the autoimmune response in multiple sclerosis. *Eur J Immunol*. 2008 May;38(5):1297-309.

19. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008 Sep 1;112(5):1557-69.

20. Kanhere A, Hertweck A, Bhatia U, Gökmen MR, Perucha E, Jackson I, Lord GM, Jenner RG. T-bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2 differentiation through lineage-specific targeting of distal regulatory elements. *Nat Commun*. 2012;3:1268.

21. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*. 2014 Oct 30; pii: S1043-4666(14)00539-0.

22. Andalib A, Doulabi H, Najafi M, Tazhibi M, Rezaie A. Expression of chemokine receptors on Th1/Th2 CD4<sup>+</sup> lymphocytes in patients with multiple sclerosis. *Iran J Immunol*. 2011 Mar;8(1):1-10

22. Kleinewietfeld M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune inflammation. *Immunol Rev*. 2014 May;259(1):231-44

23. Constantino CM, Baecher-Allan C, Hafler DA. Multiple sclerosis and regulatory T cells. *J Clin Immunol*. 2008 Nov;28(6):697-706

24. Louten J, Boniface K, de Waal Malefyt R. Development and function of Th17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2009; 123(5):1004-11.

25. Dong C. Th17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8(5):337-48.

26. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human Th-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat Immunol*. 2008; 9:641-9.

27. Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human Th-17 cells. *Nature*. 2008; 454:350-2.

28. Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupe P, Barillot E, et al. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human Th-17 responses. *Nat Immunol*. 2008; 9:650-7.
29. Santarlaschi V, Maggi L, Capone M, Frosali F, Querci V, De Palma R, et al. TGFbeta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *Eur J Immunol*. 2009; 39:207-15.
30. Hemmer B, Nessler S, Zhou D, Kieseier B, Hartung HP. Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol*. 2006 Apr;2(4):201-11.
31. Romagnani S, Maggi E, Liotta F, Cosmi L, Annunziato F. Properties and origin of human Th17 cells. *Mol Immunol*. 2009; 47(1):3-7.
32. Murphy AC, Lalor SJ, Lynch MA, Mills KH. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun*. 2010; 24(4):641-51.
33. Oukka M. Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells. *Ann Rheum Dis*. 2007; 66 Suppl 3:(3) 87-90.
34. Aranami T, Yamamura T. Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergol Int*. 2008; 57(2):115-20.
35. Vojdani A, Lambert J. The Role of Th17 in Neuroimmune Disorders: Target for CAM Therapy. Part I. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011 Jul 21. doi: 10.1093/ecam/nep062.
36. Stromnes IM, Cerretti LM, Liggitt D, Harris RA, Goverman JM. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by Th1 and Th17 cells. *Nat Med*. 2008; 14(3):337-42.
37. Haas J, Hug A, Viehöver A, Fritzsche B, Falk CS, Filser A, et al. Reduced suppressive effect of CD4+CD25 high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol*. 2005; 35(11):

3343-52.

38. Saresella M, Marventano I, Longhi R, Lissoni F, Trabattoni D, Mendozzi L, et al. CD4+CD25+FoxP3+PD1-regulatory T cells in acute and stable relapsingremitting multiple sclerosis and their modulation by therapy. *FASEB J*. 2008; 22(10):3500-8.
39. Venken K, Hellings N, Broekmans T, Hensen K, Rummens JL, Stinissen P. Natural naive CD4+CD25+CD127 low regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression. *J Immunol*. 2008; 180(9):6411-20.
40. Matsui M. Progress in unravelling the etiology of multiple sclerosis. *Rinsho Shinkeigaku*. 2008 Nov;48(11):849-52.
41. Hernández-Pedro NY, Espinosa-Ramirez G, de la Cruz VP, Pineda B, Sotelo J. Initial immunopathogenesis of multiple sclerosis: innate immune response. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:413465.
42. Libbey JE, McCoy LL, Fujinami RS. Molecular mimicry in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol*. 2007;79:127-47.
43. Muller WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol*. 2003 Jun;24(6):327-34
44. Carman CV. Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by 'invadosome-like protrusions'. *J Cell Sci*. 2009 Sep 1;122(Pt 17):3025-35.
45. Luther SA, Cyster JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol*. 2001 Feb;2(2):102-7.
46. Hillyer P, Mordet E, Flynn G, Male D. Chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules on different human endothelia: discriminating the tissue-specific functions that affect leucocyte migration. *Clin Exp Immunol*. 2003 Dec;134(3):431-41.

47. Sriram S. Role of glial cells in innate immunity and their role in CNS demyelination. *J Neuroimmunol.* 2011 Oct 28;239(1-2):13-20.
48. Lehmann PV, Forsthuber T, Miller A, Sercarz EE. Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature.* 1992 Jul 9;358(6382):155-7.
49. Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlman T, Brück W. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain.* 2000 Jun;123 ( Pt 6):1174-83.
50. Lucas RM, Ponsonby AL, Dear K, Valery PC, Pender MP, Taylor BV, Kilpatrick TJ, Dwyer T, Coulthard A, Chapman C, van der Mei I, Williams D, McMichael AJ. Sun exposure and vitamin D are independent risk factors for CNS demyelination. *Neurology.* 2011 Feb 8;76(6):540-8.
51. May E, Asadullah K, Zügel U. Immunoregulation through 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and its analogs. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2004 Dec;3(4):377-9.
52. Goudarzvand M, Javan M, Mirnajafi-Zadeh J, Mozafari S, Tirahi T. Vitamins E and D<sub>3</sub> attenuate demyelination and potentiate remyelination processes of hippocampal formation of rats following local injection of ethidium bromide. *Cell Mol Neurobiol.* 2010 Mar;30(2):289-99.
53. Simon KC, van der Mei IA, Munger KL, Ponsonby A, Dickinson J, Dwyer T, Sundström P, Ascherio A. Combined effects of smoking, anti-EBNA antibodies, and HLA-DRB1\*1501 on multiple sclerosis risk. *Neurology.* 2010 Apr 27;74(17):1365-71.
54. Sibley WA, Bamford CR, Clark K. Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet.* 1985 Jun 8;1(8441):1313-5.
55. Naito S, Namerow N, Mickey MR, Terasaki PI. Multiple sclerosis: association with HL-A3. *Tissue Antigens.* 1972;2(1):1-4.
56. Link H. Contribution of CSF studies to diagnosis of multiple sclerosis. *Ital J Neurol Sci.* 1987 Jun;Suppl 6:57-69.

57. Rammohan KW. Cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Ann Indian Acad Neurol*. 2009 Oct;12(4):246-53.
58. Giovannoni G, Miller DH, Losseff NA, Sailer M, Lewellyn-Smith N, Thompson AJ, Thompson EJ. Serum inflammatory markers and clinical/MRI markers of disease progression in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2001 Jun;248(6):487-95.
59. Herndon RM, Kasckow J. Electron microscopic studies of cerebrospinal fluid sediment in demyelinating disease. *Ann Neurol*. 1978 Dec;4(6):515-23.
60. Berger T, Rubner P, Schautzer F, Egg R, Ulmer H, Mayringer I, Dilitz E, Deisenhammer F, Reindl M. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med*. 2003 Jul 10;349(2):139-45.
61. Tataru N, Vidal C, Decavel P, Berger E, Rumbach L. Limited impact of the summer heat wave in France (2003) on hospital admissions and relapses for multiple sclerosis. *Neuroepidemiology*. 2006;27(1):28-32.
62. Tsang BK, Macdonell R. Multiple sclerosis-diagnosis, management and prognosis. *Aust Fam Physician*. 2011 Dec;40(12):948-55.
63. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983 Nov;33(11):1444-52.
64. Boomer JA, Siatkowski RM. Optic neuritis in adults and children. *Semin Ophthalmol*. 2003 Dec;18 (4): 174–80.
65. Filippi M. Recent advances in MS neuroimaging. *Mult Scler Relat Disord*. 2014 Nov;3(6):767.
66. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011 Feb;69(2):292-302.

67. Hammond SR, English DR, McLeod JG. The age-range of risk of developing multiple sclerosis: evidence from a migrant population in Australia. *Brain* 2000 May;123 ( Pt 5):968-74.
68. Koch-Henriksen N, Stenager E, Brønnum-Hansen H Studies based on the Danish Multiple Sclerosis Registry. *Scand J Public Health*. 2011 Jul;39(7 Suppl):180-4
69. Burton JM, O'Connor PW, Hohol M, Beyene J. Oral versus intravenous steroids for treatment of relapses in multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Dec 12;12:CD006921.
70. Manouchehrinia A, Constantinescu CS. Cost-effectiveness of disease-modifying therapies in multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2012 Oct;12(5):592-600.
71. He D, Xu Z, Dong S, Zhang H, Zhou H, Wang L, Zhang S. Teriflunomide for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Dec 12;12:CD009882.
72. Hassan-Smith G, Douglas MR. Management and prognosis of multiple sclerosis. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2011 Nov;72(11):M174-6.
73. Freedman MS. Improving long-term follow-up studies of immunomodulatory therapies. *Neurology*. 2011 Jan 4;76(1 Suppl 1):S35-8.
74. Quizilbash N, Mendez I, Sanchez-de la Rosa R. Benefit-risk analysis of glatiramer acetate for relapsing-remitting and clinically isolated syndrome multiple sclerosis. *Clin Ther*. 2012 Jan;34(1):159-176.e5.
75. Bates D. Treatment effects of immunomodulatory therapies at different stages of multiple sclerosis in short-term trials. *Neurology*. 2011 Jan 4;76(1 Suppl 1):S14-25.
76. Killestein J, Rudick RA, Polman CH. Oral treatment for multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2011 Nov;10(11):1026-34.
77. Martinelli Boneschi F, Vacchi L, Rovaris M, Capra R, Comi G. Mitoxantrone for multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013 May 31;5:CD002127.



78. Marriott JJ, Miyasaki JM, Gronseth G, O'Connor PW; Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. Evidence Report: The efficacy and safety of mitoxantrone (Novantrone) in the treatment of multiple sclerosis: Report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2010 May 4;74(18):1463-70.
79. Balak DM, Hengstman GJ, Çakmak A, Thio HB. Cutaneous adverse events associated with disease-modifying treatment in multiple sclerosis: a systematic review. *Mult Scler*. 2012 Dec;18(12):1705-17.
80. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2010 Sep 25;376(9746):1094-108.
81. Kurban S, Akpinar Z, Mehmetoglu I. Kurban S, Akpinar Z, Mehmetoglu I. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin levels in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2008 Apr;14(3):431-2.
82. Mirzaei K, Ahmadi S, Hossein-Nezhad A, Mokhtari F. Potential role of OPG/RANKL system and FokI genotypes in pathogenesis and clinical manifestations in multiple sclerosis. *Minerva Med*. 2012 Aug;103(4):313-21.
83. Hofbauer LC, Cepok S, Hemmer B. Osteoprotegerin is highly expressed in the spinal cord and cerebrospinal fluid. *Acta Neuropathol*. 2004 Jun;107(6):575-7,
84. Martin TJ, Sims NA. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol Med*. 2005 Feb;11(2):76-81.
85. Sato K, Takayanagi H. Osteoclasts, rheumatoid arthritis, and osteoimmunology. *Curr Opin Rheumatol*. 2006 Jul;18(4):419-26.
86. Schett G, Hayer S, Zwerina J, Redlich K, Smolen JS. Mechanisms of Disease: the link between RANKL and arthritic bone disease. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2005 Nov;1(1):47-54.

87. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, Nakamura K, Taniguchi T. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signaling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature*. 2000 Nov 30;408(6812):600-5.
88. Kollet O, Dar A, Shviti S, Kalinkovich A, Lapid K, Szteinberg Y, Tesio M, Samstein RM, Goichberg P, Spiegel A, Elson A, Lapidot T. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat Med*. 2006 Jun;12(6):657-64. Epub 2006 May 21.
89. Kim NS, Kim HJ, Koo BK, Kwon MC, Kim YW, Cho Y, Yokota Y, Penninger JM, Kong YY. Receptor activator of NF-kappaB ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2. *Mol Cell Biol*. 2006 Feb;26(3):1002-13.
90. Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, Elliott R, Scully S, Voura EB, Lacey DL, Boyle WJ, Khokha R, Penninger JM. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell*. 2000 Sep 29;103(1):41-50.
91. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*. 2006 Jan;12(1):17-25.
92. Schramek D, Penninger J. The many roles of RANKL-RANK signaling in bone, breast and cancer. *IBMS BoneKey*. 2011 May;8: 237–256.
93. Hofbauer LC, Kühne CA, Viereck V. The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone disease. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2004 Sep;4(3):268-75.
94. Boyce BF, Xing L, Chen D. Osteoprotegerin, the bone receptor, is a surprising target for beta-catenin signaling. *Cell Metab*. 2005 Dec;2(6):344-5.
95. Collin-Osdoby P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circ Res*. 2004 Nov 26;95(11):1046-57.

96. Rogers A, Eastell R. Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor kappaB ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Nov;90(11):6323-31.
97. Whyte MP. Paget's disease of bone and genetic disorders of RANKL/OPG/RANKL/NF-kappaB signaling. Whyte MP. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Apr;1068:143-64.
98. Cundy T, Hegde M, Naot D, Chong B, King A, Wallace R, Mulley J, Love DR, Seidel J, Fawcner M, Banovic T, Callon KE, Grey AB, Reid IR, Middleton-Hardie CA, Cornish J. A mutation in the gene TNFRSF11B encoding osteoprotegerin causes an idiopathic hyperphosphatasia phenotype. *Hum Mol Genet.* 2002 Sep 1;11(18):2119-27.
99. Holtrop ME, King GJ. The ultrastructure of the osteoclast and its functional implications. *Clin Orthop Relat Res.* 1977 Mar-Apr;(123):177-96.
100. Teti A, Blair HC, Schlesinger P, Grano M, Zamboni-Zallone A, Kahn AJ, Teitelbaum SL, Hruska KA. Extracellular protons acidify osteoclasts, reduce cytosolic calcium, and promote expression of cell-matrix attachment structures. *J Clin Invest.* 1989 Sep;84(3):773-80.
101. Väänänen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci.* 2000 Feb;113 ( Pt 3):377-81.
102. Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science.* 1989 Aug 25;245(4920):855-7.
103. Yamashita DS, Dodds RA. Cathepsin K and the design of inhibitors of cathepsin K. *Curr Pharm Des.* 2000 Jan;6(1):1-24.
104. Ortega N, Behonick D, Stickens D, Werb Z. How proteases regulate bone morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 May;995:109-16.
105. Ti YF, Wang R, Zhao JN. Mechanism of osteoclast in bone resorption. *Zhongguo Gu Shang.* 2014 Jun;27(6):529-32. *PMID: 25241478*

106. Sharma SM, Bronisz A, Hu R, Patel K, Mansky KC, Sif S, Ostrowski MC. MITF and PU.1 recruit p38 MAPK and NFATc1 to target genes during osteoclast differentiation. *J Biol Chem*. 2007 May 25;282(21):15921-9.
107. Rubin J, Fan D, Wade A, Murphy TC, Gewant H, Nanes MS, Fan X, Moerenhout M, Hofstetter W. Transcriptional regulation of the expression of macrophage colony stimulating factor. *Mol Cell Endocrinol*. 2000 Feb 25;160(1-2):193-202.
108. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol*. 2007 Apr;7(4):292-304.
109. Kim HS, Kim DK, Kim AR, Mun SH, Lee SK, Kim JH, Kim YM, Choi WS. Fyn positively regulates the activation of DAP12 and FcR $\gamma$ -mediated costimulatory signals by RANKL during osteoclastogenesis. *Cell Signal*. 2012 Jun;24(6):1306-14.
110. Wada T, Nakashima T, Oliveira-dos-Santos AJ, Gasser J, Hara H, Schett G, Penninger JM. The molecular scaffold Gab2 is a crucial component of RANK signaling and osteoclastogenesis. *Nat Med*. 2005 Apr;11(4):394-9.
111. Yi T, Lee HL, Cha JH, Ko SI, Kim HJ, Shin HI, Woo KM, Ryoo HM, Kim GS, Baek JH. Epidermal growth factor receptor regulates osteoclast differentiation and survival through crosstalking with RANK signaling. *J Cell Physiol*. 2008 Nov;217(2):409-22.
112. Bai S, Kitaura H, Zhao H, Chen J, Muller JM, Schule R, Darnay B, Novack DV, Ross FP, Teitelbaum SL. FHL2 inhibits the activated osteoclast in a TRAF6-dependent manner. *J Clin Invest*. 2005 Oct;115(10):2742-51.
113. Kim HJ, Zhang K, Zhang L, Ross FP, Teitelbaum SL, Faccio R. The Src family kinase, Lyn, suppresses osteoclastogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb;106(7):2325-30.

114. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*. 1997 Nov 13;390(6656):175-9.
115. Leong KG, Karsan A. Signaling pathways mediated by tumor necrosis factor alpha. *Histol Histopathol*. 2000 Oct;15(4):1303-25.
116. Boyce BF, Xing L. The RANKL/RANK/OPG pathway. *Curr Osteoporos Rep*. 2007 Sep;5(3):98-104.
117. Kuroda Y, Hisatsune C, Nakamura T, Matsuo K, Mikoshiba K. Osteoblasts induce  $Ca^{2+}$  oscillation-independent NFATc1 activation during osteoclastogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jun 24; 105(25):8643-8.
118. Kuroda Y, Matsuo K. Molecular mechanisms of triggering, amplifying and targeting RANK signaling in osteoclasts. *World J Orthop*. Nov 18, 2012; 3(11): 167–174.
119. Crabtree GR, Olson EN. NFAT signaling: choreographing the social lives of cell. *Cell*. 2002 Apr;109 Suppl:S67-79.
120. Feng W, Xia W, Ye Q, Wu W. Osteoclastogenesis and osteoimmunology. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2014 Jan 1;19:758-67.
121. Kim Y, Sato A, Asagiri M, Morita I, Soma K, Takayanagi H. Contribution of nuclear factor of activated T cells c1 to the transcriptional control of immunoreceptor osteoclast-associated receptor but not triggering receptor expressed by myeloid cells-2 during osteoclastogenesis. *J Biol Chem*. 2005 Sep 23;280(38):32905-13.
122. Kim K, Kim JH, Lee J, Jin HM, Lee SH, Fisher DE, Kook H, Kim KK, Choi Y, Kim N. Nuclear factor of activated T cells c1 induces osteoclast-associated receptor gene expression during tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine-mediated osteoclastogenesis. *J Biol Chem*. 2005 Oct 21;280(42):35209-16.

123. Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, Carrasquillo M, Rogaeva E, Majounie E, Cruchaga C, Sassi C, Kauwe JS, Younkin S, Hazrati L, Collinge J, Pocock J, Lashley T, Williams J, Lambert JC, Amouyel P, Goate A, Rademakers R, Morgan K, Powell J, St George-Hyslop P, Singleton A, Hardy J. TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2013 Jan;368(2):117–27.
124. Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM, Robey PG. Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin Orthop Relat Res*. 1992 Aug;(281):275-94.
125. Robey PG, Fedarko NS, Hefferan TE, Bianco P, Vetter UK, Grzesik W, Friedenstein A, Van der Pluijm G, Mintz KP, Young MF, et al. Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *J Bone Miner Res*. 1993 Dec;8 Suppl 2:S483-7.
126. Yamaguchi A, Kahn AJ. Clonal osteogenic cell lines express myogenic and adipocytic developmental potential. *Calcif Tissue Int*. 1991 Sep;49(3):221-5.
127. Blair HC, Zaidi M, Huang CL, Sun L. The developmental basis of skeletal cell differentiation and the molecular basis of major skeletal defects. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2008 Nov;83(4):401-15.
128. Geng S, Zhou S, Bi Z, Glowacki J. Vitamin D metabolism in human bone marrow stromal (mesenchymal stem) cells. *Metabolism*. 2013 Jun;62(6):768-77.
129. Wiktor-Jedrzejczak W, Bartocci A, Ferrante AW Jr, Ahmed-Ansari A, Sell KW, Pollard JW, Stanley ER. Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jun;87(12):4828-32.
130. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997 Apr 18;89(2):309-19.

131. Guerrini MM, Takayanagi H. The immune system, bone and RANKL. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Nov 1;561:118-23.
132. Danks L, Takayanagi H. Immunology and bone. *J Biochem*. 2013 Jul;154(1):29-39.
133. Akiyama T, Shinzawa M, Qin J, Akiyama N. Regulations of gene expression in medullary thymic epithelial cells required for preventing the onset of autoimmune diseases. *Front Immunol*. 2013 Aug 26;4:249.
134. Desanti GE, Cowan JE, Baik S, Parnell SM, White AJ, Penninger JM, Lane PJ, Jenkinson EJ, Jenkinson WE, Anderson G. Developmentally regulated availability of RANKL and CD40 ligand reveals distinct mechanisms of fetal and adult cross-talk in the thymus medulla. *J Immunol*. 2012 Dec 15;189(12):5519-26.
135. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*. 1999 Jan 28;397(6717):315-23.
136. Moschen AR, Kaser A, Enrich B, Ludwiczek O, Gabriel M, Obrist P, Wolf AM, Tilg H. The RANKL/OPG system is activated in inflammatory bowel disease and relates to the state of bone loss. *Gut*. 2005 Apr;54(4):479-87.
137. Ashcroft AJ, Cruickshank SM, Croucher PI, Perry MJ, Rollinson S, Lippitt JM, Child JA, Dunstan C, Felsburg PJ, Morgan GJ, Carding SR. Colonic dendritic cells, intestinal inflammation, and T cell-mediated bone destruction are modulated by recombinant osteoprotegerin. *Immunity*. 2003 Dec;19(6):849-61.
138. Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ, Penninger JM. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*. 1999 Nov 18;402(6759):304-9.

139. Takayanagi H. Osteoimmunology and the effects of the immune system on the bone. *Nat Rev Rheumatol.* 2009 Dec;5(12):667-76.
140. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, Tanaka S, Kodama T, Akira S, Iwakura Y, Cua DJ, Takayanagi H. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med.* 2006 Nov 27;203(12):2673-82.
141. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest.* 1999 May;103(9):1345-52.
142. Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest.* 2006 May;116(5):1218-22.
143. Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov.* 2012 Oct;11(10):763-76.
144. Nishihara M, Ogura H, Ueda N, Tsuruoka M, Kitabayashi C, Tsuji F, Aono H, Ishihara K, Huseby E, Betz UA, Murakami M, Hirano T. IL-6-gp 130-STAT3 in T cells directs the development of IL-17+ Th with a minimum effect on that of Treg in the steady state. *Int Immunol.* 2007 Jun;19(6):695-702.
145. Nardelli DT, Burchill MA, England DM, Torrealba J, Callister SM, Schell RF. Association of CD4+ CD25+ T cells with prevention of severe destructive arthritis in *Borrelia burgdorferi*-vaccinated and challenged gamma interferon-deficient mice treated with anti-interleukin-17 antibody. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004 Nov;11(6):1075-84.
146. Frey O, Petrow PK, Gajda M, Siegmund K, Huehn J, Scheffold A, Hamann A, Radbruch A, Bräuer R. The role of regulatory T cells in antigen-induced arthritis: aggravation of arthritis after depletion and amelioration after transfer of CD4+CD25+ T cells. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(2):R291-301.



147. Weinstock-Guttman B, Hong J, Santos R, Tamaño-Blanco M, Badgett D, Patrick K, Baier M, Feichter J, Gallagher E, Garg N, Ramanathan M. Interferon-beta modulates bone-associated cytokines and osteoclast precursor activity in multiple sclerosis patients. *Mult Scler*. 2006 Oct;12(5):541-50.
148. Cosman F, Nieves J, Komar L, Ferrer G, Herbert J, Formica C, Shen V, Lindsay R. Fracture history and bone loss in patients with MS. *Neurology*. 1998 Oct;51(4):1161-5.
149. Huang Z, Qi Y, Du S, Chen G, Yan W. Bone mineral density levels in adults with multiple sclerosis: A meta-analysis. *Int J Neurosci*. 2014 Nov 18:1-21.
150. Khachanova NV, Demina TL, Smirnov AV, Gusev EI. Risk factors of osteoporosis in women with multiple sclerosis. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*. 2006;Spec No 3:56-63.
151. Zorzon M, Zivadinov R, Locatelli L, Giuntini D, Tonic M, Bosco A, Nasuelli D, Bratina A, Tommasi MA, Rudick RA, Cazzato G. Long-term effects of intravenous high dose methylprednisolone pulses on bone mineral density in patients with multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2005 Jul;12(7):550-6.
152. Dovio A, Perazzolo L, Osella G, Ventura M, Termine A, Milano E, Bertolotto A, Angeli A. Immediate fall of bone formation and transient increase of bone resorption in the course of high-dose, short-term glucocorticoid therapy in young patients with multiple sclerosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Oct;89(10):4923-8.
153. Maimone D, Reder AT, Gregory S. T cell lymphokine-induced secretion of cytokines by monocytes from patients with multiple sclerosis. *Cell Immunol*. 1993 Jan;146(1):96-106.
154. Tsukada N, Miyagi K, Matsuda M, Yanegisawa N, Yone K. Tumor necrosis factor and interleukin-1 in the CSF and sera of patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 1991 Aug;104(2):230-4.

155. Krumbholz M, Theil D, Cepok S, Hemmer B, Kivisäkk P, Ransohoff RM, Hofbauer M, Farina C, Derfuss T, Hartle C, Newcombe J, Hohfeld R, Meinl E. Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain*. 2006 Jan;129(Pt 1):200-11.
156. Sellebjerg F, Bendtzen K, Christiansen M, Frederiksen J. Cytokines and soluble IL-4 in patients with acute optic neuritis and multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 1997 Jan;4(1):59-67.
157. Oldknow KJ, MacRae VE, Farquharson C. The endocrine role of bone: recent and emerging perspectives beyond osteocalcin. *J Endocrinol*. 2015 Feb 5.
158. Bowers GN Jr, McComb RB. Measurement of total alkaline phosphatase activity in human serum. *Clin Chem*. 1975 Dec;21(13):1988-95.
159. Weiss MJ, Ray K, Henthorn PS, Lamb B, Kadesch T, Harris H. Structure of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem*. 1988 Aug 25;263(24):12002-10.
160. Mundy GR. Osteoporosis and inflammation. *Nutr Rev*. 2007 Dec;65(12 Pt 2):S147-51.
161. Van Campenhout A, Golledge J. Osteoprotegerin, vascular calcification and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2009 Jun;204(2):321-9.
162. Kiechl S, Wittmann J, Giaccari A, Knoflach M, Willeit P, Bozec A, Moschen AR, Muscogiuri G, Sorice GP, Kireva T, Summerer M, Wirtz S, Luther J, Mielenz D, Billmeier U, Egger G, Mayr A, Oberhollenzer F, Kronenberg F, Orthofer M, Penninger JM, Meigs JB, Bonora E, Tilg H, Willeit J, Schett G. Blockade of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (RANKL) signaling improves hepatic insulin resistance and prevents development of diabetes mellitus. *Nat Med*. 2013 Mar;19(3):358-63.
163. Alatab S, Maghbooli Z, Hossein-Nezhad A, Khosrofar M, Mokhtari F. Cytokine profile, Foxp3 and nuclear factor- $\kappa$ B ligand levels in multiple sclerosis subtypes. *Minerva Med*. 2011 Dec;102(6):461-8.

164. Soilu-Hänninen M, Koskinen JO, Laaksonen M, Hänninen A, Lilius EM, Waris M. High sensitivity measurement of CRP and disease progression in multiple sclerosis. *Neurology*. 2005 Jul 12;65(1):153-5.
165. Warriner AH, Saag KG. Prevention and treatment of bone changes associated with exposure to glucocorticoids. *Curr Osteoporos Rep*. 2013 Dec;11(4):341-7.
166. Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone and Beyond. *Front Immunol*. 2014 Oct 20;5:511.
167. Walsh MC, Choi Y. Biology of the TRANCE axis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003 Jun-Aug;14(3-4):251-63.
168. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, Daro E, Smith J, Tometsko ME, Maliszewski CR, Armstrong A, Shen V, Bain S, Cosman D, Anderson D, Morrissey PJ, Peschon JJ, Schuh J. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev*. 1999 Sep 15;13(18):2412-24.
169. Walsh MC, Kim N, Kadono Y, Rho J, Lee SY, Lorenzo J, Choi Y. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:33-63.
170. Takayanagi H. New developments in osteoimmunology. *Nat Rev Rheumatol*. 2012 Nov;8(11):684-9.
171. Komatsu N, Okamoto K, Sawa S, Nakashima T, Oh-hora M, Kodama T, Tanaka S, Bluestone JA, Takayanagi H. Pathogenic conversion of Foxp3<sup>+</sup> T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nat Med*. 2014 Jan;20(1):62-8.
172. Green EA, Choi Y, Flavell RA. Pancreatic lymph node-derived CD4(+)CD25(+) Treg cells: highly potent regulators of diabetes that require TRANCE-RANK signals. *Immunity*. 2002 Feb;16(2):183-91.

173. Naumann U, Wick W, Beschoner R, Meyermann R, Weller M. Expression and functional activity of osteoprotegerin in human malignant gliomas. *Acta Neuropathol.* 2004 Jan;107(1):17-22.
174. Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts and prospects. *J Clin Invest.* 2005 Dec;115(12):3318-25.
175. Šućur A, Katavić V, Kelava T, Jajić Z, Kovačić N, Grčević D. Introduction of osteoclast progenitors in inflammatory conditions: key to bone destruction in arthritis. *Int Orthop.* 2014 Sep;38(9):1893-903.
176. Kovacic N, Croucher PI, McDonald MM. Signaling between tumor cells and the host bone marrow microenvironment. *Calcif Tissue Int.* 2014 Jan;94(1):125-39.
177. Dimisianos N, Rodi M, Kalavrizioti D, Georgiu V, Papathanasopoulos P, Mouzaki A. Cytokines as Biomarkers of Treatment Response to IFN  $\beta$  in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Mult Scler Int.* 2014;2014:436764.
178. Rossi S, Studer V, Motta C, Germani G, Macchiarulo G, Buttari F, Mancino R, Castelli M, De Chiara V, Weiss S, Martino G, Furlan R, Centonze D. Cerebrospinal fluid detection of interleukin-1 $\beta$  in phase of remission predicts disease progression in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation.* 2014 Feb 18;11:32.
179. Rossi S, Motta C, Studer V, Barbieri F, Buttari F, Bergami A, Sancesario G, Bernardini S, De Angelis G, Martino G, Furlan R, Centonze D. Tumor necrosis factor is elevated in progressive multiple sclerosis and causes excitotoxic neurodegeneration. *Mult Scler.* 2014 Mar;20(3):304-12.
180. Maxeiner HG, Marion Schneider E, Kurfiss ST, Brettschneider J, Tumani H, Bechter K. Cerebrospinal fluid and serum cytokine profiling to detect immune control of infectious and inflammatory neurological and psychiatric diseases. *Cytokine.* 2014 Sep;69(1):62-7.
181. Cheng W, Chen G. Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:659206.

182. Bose S, Cho J. Role of chemokine CCL2 and its receptor CCR2 in neurodegenerative diseases. *Arch Pharm Res.* 2013 Sep;36(9):1039-50.
183. McClung M. Role of RANKL inhibition in osteoporosis. *Arthritis Res Ther.* 2007;9 Suppl 1:S3.
184. Lerner UH. New molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptor superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption. *Crit Rev Oral Biol. Med* 2004;15: 64–81.
185. Bekker PJ, Holloway D, Nakanishi A, Arrighi M, Leese PT, Dunstan CR. The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2001;16:348–60.
186. Diab DL, Watts NB. Postmenopausal osteoporosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2013 Dec;20(6):501-9.
187. Polyzos SA, Singhellakis PN, Naot D, Adamidou F, Malandrinou FC, Anastasilakis AD, Polymerou V, Kita M. Denosumab treatment for juvenile Paget's disease: results from two adult patients with osteoprotegerin deficiency ("Balkan" mutation in the TNFRSF11B gene). Polyzos SA, Singhellakis PN, Naot D, Adamidou F, Malandrinou FC, Anastasilakis AD, Polymerou V, Kita M. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Mar;99(3):703-7.

## 10. ŽIVOTOPIS

Anton Glasnović rođen je u Đakovu 29. lipnja 1981. godine. Osnovnu školu završio je 1995. godine u Zagrebu, a *I. gimnaziju* je završio također u Zagrebu 1999. godine. Iste godine, upisuje Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu te ga završava u roku, odnosno 2005. godine, nakon čega stažira za Kliniku za endokrinologiju, bolesti metabolizma i dijabetes *Vuk Vrhovac* te 2006. godine sječe pravo na samostalan rad. Od 2006. do 2007. godine radio je kao znanstveni novak - asistent na Katedri za anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. 2007. godine započinje specijalizaciju iz neurologije u Kliničkoj bolnici *Dubrava* i polaže specijalistički ispit 2011. godine, kada stječe naziv specijalista neurologije te do danas radi na Zavodu za neurologiju Kliničke bolnice *Dubrava*.

### Publikacije:

1. Šarac J, Sarić T, Auguštin DH, Jeran N, Kovačević L, Cvjetan S, Lewis AP, Metspalu E, Reidla M, Novokmet N, Vidović M, Nevajda B, **Glasnović A**, Marjanović D, Missoni S, Villems R, Rudan P. Maternal genetic heritage of Southeastern Europe reveals a new Croatian isolate and novel, local sub-branching in the x2 haplogroup. *Ann Hum Genet.* 2014 May;78(3):178-94.
2. **Glasnović A**, Cvija H, Stojić M, Tudorić-Đeno I, Ivčević S, Romić D, Tičinović N, Vuletić V, Lazibat I, Grčević D. Decreased level of sRAGE in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients at clinical onset. *Neuroimmunomodulation.* 2014;21(5):226-33.
3. Čavka M, **Glasnović A**, Janković I, Šikanjić PR, Perić B, Brkljačić B, Mlinarić-Missoni E, Škrilin J. Microbiological analysis of a mummy from the archeological museum in Zagreb. *Coll Antropol.* 2010 Sep;34(3):803-5.